

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Michel ISTIN

"Rôle du manteau dans le métabolisme du calcium
chez les lamellibranches."

Soutenue le 19 février 1970, devant la commission d'examen

M. JOST

Président

M. MOREL

M. MAETZ

M. COURSAGET

} Examineurs

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Michel ISTIN

"Rôle du manteau dans le métabolisme du calcium
chez les lamellibranches."

Soutenue le 19 février 1970, devant la commission d'examen

M. JOST

Président

M. MOREL

M. MAETZ

M. COURSAGET

} Examineurs

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR EN SCIENCES NATURELLES

PAR

MICHEL LÉVY



Rôle du magnésium dans le métabolisme du calcium
chez les mammifères

Soutenue le 19 février 1970 devant la commission d'examen

Président

M. LOST

Examinateurs

M. MOREL

M. WETZ

M. CHASSAGET

Rôle du manteau dans le métabolisme du calcium chez les lamellibranches

Par M. ISTIN *

RÉSUMÉ :

Chez les vertébrés le calcium est déposé par un tissu diffus, d'un abord expérimental difficile. Au contraire, certains invertébrés et notamment les lamellibranches possèdent avec le manteau un tissu facile à étudier qui est responsable de la formation de leur coquille. Celle-ci est constituée pour une grande part de carbonate de calcium. Les métabolismes du CO_2 et du calcium dans le manteau sont décrits et discutés en relation avec le processus de calcification. Ce travail a nécessité l'emploi de techniques diverses : électrophysiologiques, cinétique isotopique, biochimiques, histologiques et radioautographiques.

SUMMARY :

In the vertebrates, calcification is obtained in a diffuse tissue which is difficult to study. On the contrary, some invertebrates particularly the lamellibranchs possess with the mantle an easily isolated tissue which is responsible of the shell formation. This shell contains mostly calcium carbonate. The metabolisms of CO_2 and calcium in the mantle are described and discussed in relation with calcification. The present investigations have been performed with the help of electrophysiological, biochemical, histological and radioautographic techniques together with isotopic kinetic studies.

L'importance, qualitative ou quantitative, des ions bivalents, est au moins égale pour les êtres vivants à celle des ions monovalents. Le calcium, par exemple, est le plus abondant des cations du corps humain : il en représente environ 1,65 % en poids. La croûte terrestre elle-même est composée pour 3,63 % de calcium, et, fait plus remarquable, tous les dépôts géologiques de la biosphère ont eu pour origine des organismes vivants. Ces quelques indications situent parfaitement l'intérêt que peut représenter l'étude de son métabolisme.

Les propriétés chimiques et physiques de ces ions bivalents expliquent la place qu'ils tiennent en biologie. En effet, ils peuvent donner des sels simples, solubles ou insolubles, avec les anions cou-

rants et leurs deux valences favorisent la formation d'organométalliques ou de complexes avec certaines protéines. Ainsi le calcium se retrouve sous une forme précipitée dans le squelette des animaux, que ce squelette soit interne ou externe. Il existe également sous forme libre ou combinée dans les liquides des organismes, ce qui lui permet d'intervenir à de très nombreux niveaux : action sur le rythme cardiaque, sur l'excitabilité des cellules nerveuses, sur les propriétés de perméabilité des membranes et l'adhésion des cellules entre elles. Toutes ces propriétés justifient l'attention apportée au calcium dans un laboratoire dont le but principal est l'étude des mécanismes qui régissent les mouvements des ions au niveau des membranes biologiques.

* Groupe de biologie marine du Département de Biologie du C.E.A., Station Zoologique, 06-Villefranche-sur-Mer.

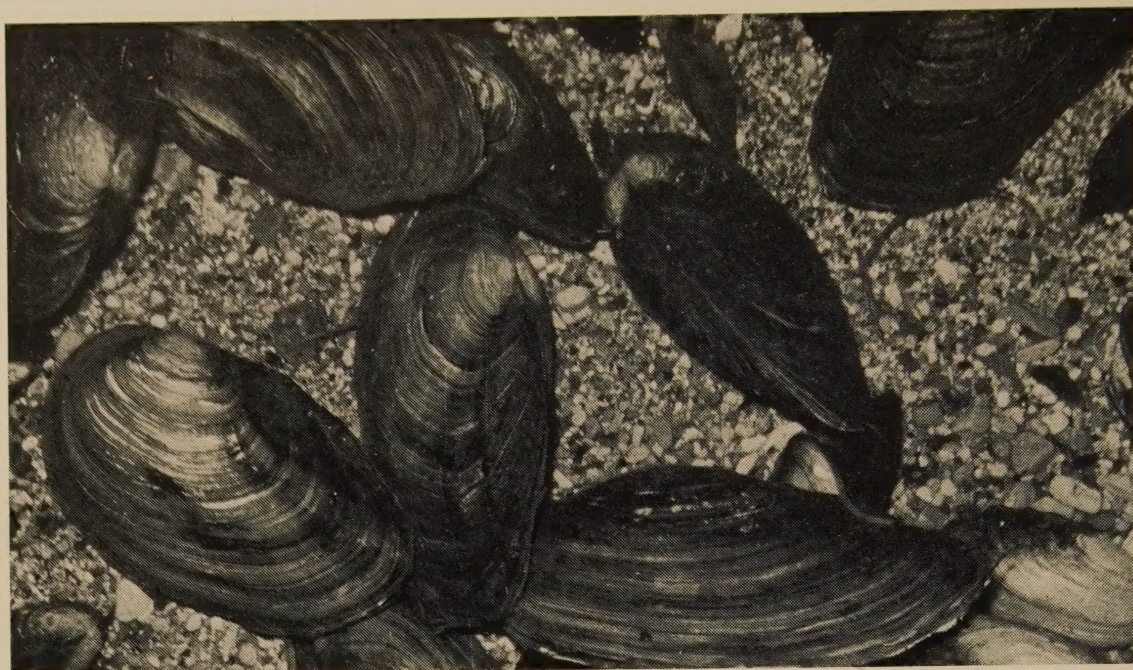


FIG. 1. — Moules d'eau douce (*Anodonta cygnea*) utilisées pour l'étude du métabolisme du calcium. Cette espèce vit généralement dans des eaux calcaires. La taille des spécimens photographiés varie de 7 à 12 cm.

L'étude des passages d'ions à travers les membranes biologiques peut s'effectuer sur différents types de matériel vivant comme cela ressort des chapitres précédents de ce numéro du *B.I.S.T.* Le choix se portera sur un tissu ou un organe représentant une population de cellules aussi homogène que possible et qui soit le siège de transports importants pour l'ion étudié. Les tissus susceptibles d'effectuer des transports de calcium sont rares. C'est toutefois le cas de l'intestin des mammifères et des tissus responsables de l'ossification. Chez les animaux supérieurs, le calcium est déposé par un tissu diffus, peu pratique à étudier. Par contre les invertébrés et notamment les lamellibranches bivalves possèdent un tissu simple de structure et simple à étudier *in vitro* qui est responsable du dépôt du calcaire coquillier. Un deuxième facteur rend également ces animaux intéressants pour l'étude du métabolisme du calcium : alors que les apports calciques chez les mammifères sont purement alimentaires, c'est par absorption à travers des membranes que certains organismes aquatiques et marins puisent, dans le milieu où ils vivent, le calcium dont ils ont besoin. Cela est probablement le cas du manteau des mollusques (fig. 1), organe bien adapté à l'étude des mécanismes de la calcification (voir Bevelander et Martin, 1949). Ce mince feuillet est soudé sur son pourtour aux bords de la coquille, formant avec celle-ci une cavité (cavité extrapalléale) remplie d'une solution de composition ionique voisine de celle du sang ou hémolymphe (fig. 2). Le milieu externe est 3 à 4 fois moins concentré en calcium que le milieu intérieur et le liquide extrapalléal. Certaines parties situées à la surface du corps de l'animal doivent être perméables au calcium pour compenser, par une

absorption simultanée, les pertes dues à la formation de la coquille, à l'élimination par l'urine et à la diffusion dans le milieu. La branchie et l'intestin sont des sites possibles pour cette absorption à partir du milieu extérieur chez des animaux qui sont arrivés à un stade d'évolution plus avancé. Le manteau des moules d'eau douce pourrait avoir un rôle comparable.

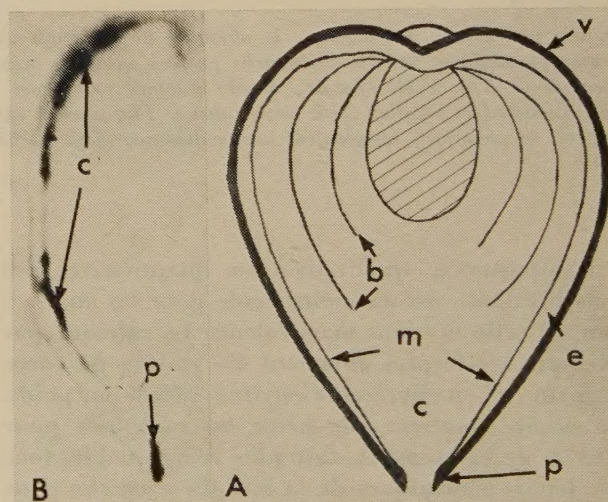


FIG. 2. — A. Coupe schématique d'une moule. Les deux valves de la coquille (V) forment le manteau (m) qui est soudé par sa bordure palléale (p) une cavité close : la cavité extrapalléale (e). Dans la cavité palléale (c) se trouvent les branchies (b) et le reste du corps de l'animal ; elle communique avec l'extérieur. — B. Radioautographie d'une coquille de moule d'eau douce. L'animal est conservé un mois dans un aquarium dont l'eau contient du ^{45}Ca . Remarquer les traces radioautographiques le long de la bordure palléale (p), dans la zone de croissance en longueur de la coquille, ainsi que dans la partie centrale (c) qui correspond à la zone de croissance en épaisseur. Exposition : un mois.

A l'aide d'une préparation *in vitro* mise au point sur l'huître par Hirata (1953) et utilisée par Jodrey (1953) et Wilbur (1960), ces transports de calcium à travers le manteau, de la cavité vers le liquide extrapalléal, ont été mis en évidence. Toutefois ces études, incomplètes, apportent peu d'informations sur la nature des mécanismes impliqués dans de tels mouvements d'ions : transports actifs * de la cavité vers la coquille ou simple diffusion passive. Un autre paramètre pouvant justifier du choix de ce matériel biologique est la différence de potentiel (d.d.p.) localisée par certains auteurs au niveau du manteau (voir Lund, 1947 ; Kirschner et col., 1960 ; Istín et Maetz, 1964). En effet, l'existence d'une barrière de potentiel électrique au niveau d'une membrane cellulaire trouve son origine dans les mouvements des ions. La valeur de la différence de potentiel est sous la dépendance de la concentration du calcium dans les solutions baignant les deux faces du manteau. Malheureusement, si les études électrophysiologiques représentent une bonne approche dans la compréhension des mécanismes, les résultats apparemment contradictoires déjà publiés nécessitent une nouvelle réinvestigation du problème.

Ainsi l'étude du métabolisme du calcium au niveau du manteau de la moule est susceptible d'apporter des enseignements de deux ordres : le premier est relatif au mécanisme permettant le passage des ions calcium au travers les membranes des cellules qui constituent le manteau. Le second, plus général, porte sur l'étude des métabolismes des constituants minéraux de la coquille, c'est-à-dire le calcium et les ions carbonate et bicarbonate. Un travail de cinétique permettra de situer les problèmes au niveau de l'organe entier que représente le manteau. L'étude électrophysiologique qui suivra apportera des informations sur les mécanismes situés au seul niveau des membranes cellulaires. Ensuite, par un travail biochimique et physiologique, des informations à l'échelle des réactions biochimiques seront obtenues. Finalement une étude histologique et radioautographique, en permettant une localisation des phénomènes étudiés à une échelle microscopique, introduira une relation entre la structure et la fonction, ce qui nous ramènera à l'organe entier. Les problèmes relatifs à la calcification de la coquille (précipitation dans la trame protéique) n'ont pas été abordés. Wilbur (1964) en a fait une étude approfondie.

I. — PERMÉABILITÉ DES MEMBRANES

(D'après ISTIN, M. et J. MAETZ, 1964 ;
ISTIN, M., 1968)

Les études qui vont suivre ont été effectuées sur quatre espèces de moules d'eau douce ; deux es-

pèces sont d'origine française : *Anodonta cygnea* et *Margarita margaritifera* et deux espèces d'origine américaine : *Anodonta grandis* et *Amblema costata*. Bien que les conditions écologiques de leurs gisements d'origine (richesse en calcium des eaux dans lesquelles vivent les moules) soient différentes, les mécanismes étudiés se retrouvent pour chacune de ces espèces. Les animaux sont conservés au laboratoire dans des aquariums alimentés en circuit ouvert avec de l'eau non chlorée et dont la température peut varier de 15° à 20 °C. Seuls les animaux capables de refermer leurs valves sous l'effet d'un stimulus externe sont utilisés pour les expériences. La majorité de ces dernières étant effectuées *in vitro*, le contrôle des mouvements ciliaires et de la consommation d'oxygène a permis de s'assurer de la survie des fragments de tissu dans les conditions expérimentales et dans les milieux artificiels utilisés.

Une solution saline a été reconstituée pour imiter la composition ionique de l'hémolymphe (Potts, 1954 ; Istín et Kirschner, 1968). Sa formule est donnée par le Tableau I. Cette solution est gazéifiée avec un mélange Oxygène-95 %, CO₂-5 % et son pH final est de 7,2. Lorsque la concentration du calcium ionique est modifiée au cours d'une expérience, il est nécessaire d'ajouter du mannitol pour ne pas entraîner de variation de la pression osmotique.

Seule la partie centrale du manteau est utilisée pour les expériences. Elle est responsable de la croissance en épaisseur de la coquille alors que la bordure palléale est responsable de la croissance en longueur (fig. 2b). Le tissu est excisé du reste du corps de l'animal en deux fragments, chacun correspondant à une valve. Ces parties du manteau se présentent sous la forme d'un mince feuillet limité par deux couches unicellulaires de cellules épithéliales, séparées par du tissu interstitiel dans lequel circule le sang de ces animaux qui ne pos-

TABLEAU I
Composition ionique du sang artificiel
préparé pour les expériences
sur les moules d'eau douce

Calcium	Sodium	Potassium	Chlorures	Bicarbonates
12,0	15,3	0,5	13,1	14,7
Valeurs exprimées en milliéquivalents par litre. (D'après Istín et Kirschner, 1968.)				

* Un transport d'ions est dit « actif » lorsqu'il est dirigé contre un gradient électrochimique.

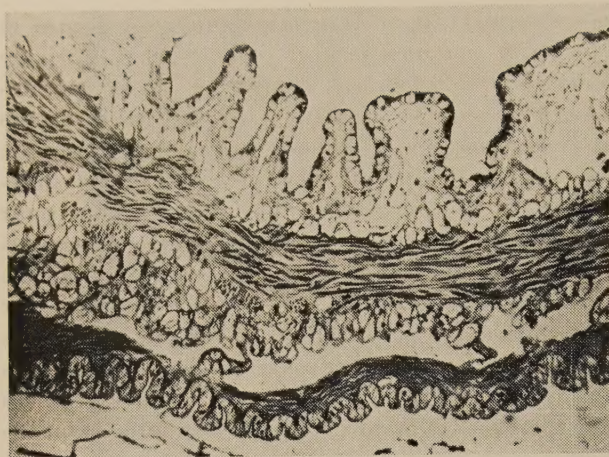


FIG. 3. — Coupe histologique de la portion centrale d'un manteau de moule d'eau douce. Ce tissu est limité par deux épithéliums. Dans la partie interstitielle, circule l'hémolymphe ou sang de ces animaux. L'épithélium inférieur est situé contre la coquille. Grossissement : 300 fois, coloration : Kernechtrot (d'après Istín, M. et L.B. Kirschner, 1968).

sèdent pas de système circulatoire clos (fig. 3). Chaque fragment est serré entre deux chambres en plexiglass suivant un schéma classique dans l'étude *in vitro* des transports d'ions à travers des épithéliums (fig. 4). Chacune des chambres ainsi délimitée est remplie de la solution saline qui permet de maintenir le fragment de tissu en survie. Cette solution est brassée et aérée d'une manière continue.

A) Étude cinétique des mouvements du calcium.

Le montage expérimental décrit ci-dessus peut être assimilé à un système à trois compartiments*. Chaque épithélium représente une barrière séparant deux compartiments. L'utilisation de radio-calcium comme indicateur nucléaire est indispensable pour déterminer la valeur du coefficient K de transfert du calcium d'un compartiment vers l'autre dans un système à l'état stationnaire. Ce coefficient est une caractéristique de la barrière pour le calcium. Il représente la fraction du compartiment, auquel il se réfère, échangée par unité de temps (exprimée en $\% \text{ h}^{-1}$). L'état stationnaire** est obtenu par une période préalable de mise à l'équilibre du manteau isolé dans la solution sa-

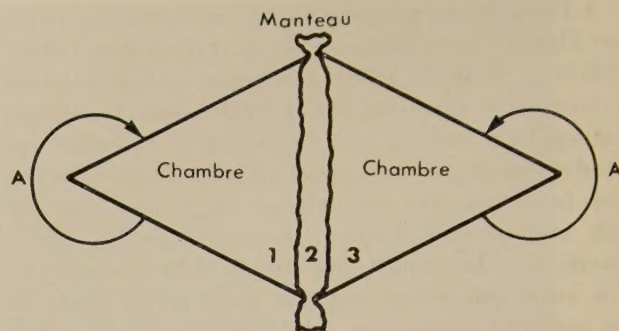


FIG. 4. — Schéma du montage expérimental utilisé pour les mesures des flux de calcium à travers le manteau des moules. Le tissu est serré entre deux chambres en plexiglass. Les solutions placées dans les chambres sont aérées et brassées à l'aide de deux dispositifs en verre (A). Les compartiments 1, 2 et 3 sont visualisés (d'après Istín, M., 1968).

line utilisée pour les expériences. Des contrôles ont permis de fixer à 12 heures environ la durée de cette période préparatoire.

S'il n'y a pas d'effet isotopique, dans un système à l'état stationnaire, les transferts de calcium stable suivent les mêmes lois que ceux de calcium radioactif. Les coefficients de transfert qui sont donc les mêmes pour l'isotope stable et l'indicateur nucléaire, permettent le calcul des flux* de calcium. Le montage expérimental est assimilable à un système de trois compartiments en série (fig. 5). Il est alors nécessaire de recueillir quatre informations différentes pour pouvoir calculer les quatre coefficients de perméabilité définissant ce système. L'expérimentateur n'a évidemment accès qu'aux compartiments les plus externes au cours de la manipulation et au compartiment central (le manteau) en fin de travail. Ces conditions rendent possible deux schémas expérimentaux :

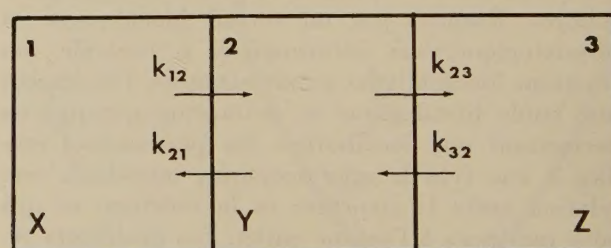


FIG. 5. — Schéma théorique à trois compartiments : (1) compartiment palléal, (2) manteau, (3) compartiment extrapalléal. Les K_{ij} représentent les coefficients de transfert du calcium des compartiments i vers les compartiments j . X, Y, Z sont les quantités de radiocalcium présente à chaque instant dans les compartiments 1, 2 et 3.

* Le terme « compartiment » au-delà de son sens usuel se définit comme un ensemble d'ions ou de molécules, d'une espèce déterminée, ayant une même probabilité de subir un événement donné, par exemple de quitter le compartiment ou de prendre part à une réaction chimique.

** Un système de plusieurs compartiments sera dit à l'état stationnaire lorsque la quantité d'ions ou de molécules quittant les compartiments sera compensée à chaque instant par des mouvements en sens inverse.

* Les mouvements unidirectionnels d'ions s'appellent des flux. Un flux net est la différence entre ce qui entre et ce qui sort d'un compartiment. Il peut être positif, négatif ou nul.

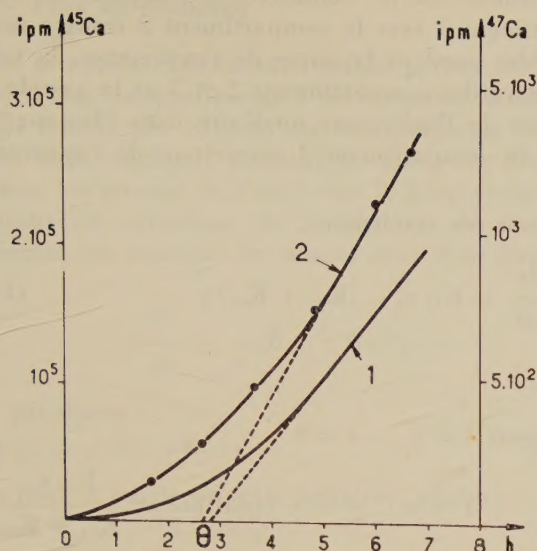


FIG. 6. — Expérience de double marquage. Les courbes représentées sont les courbes cumulatives de l'apparition du radiocalcium après passage à travers le tissu : courbe (1) dans le sens environnement vers la cavité extra-palléale, courbe (2) en sens inverse. En abscisse, le temps en heures, en ordonnées : courbe (1) ipm. de ^{47}Ca , courbe (2) en ipm. de ^{45}Ca (d'après Istin, M. et J. Maetz, 1964).

1. - La mesure de flux unidirectionnels.

En mettant l'indicateur nucléaire (^{45}Ca par exemple) dans le compartiment 1, son apparition est suivie dans le compartiment 3 ; l'expérience inverse est réalisée simultanément (mesure des passages du calcium de 3 vers 1 en utilisant du ^{47}Ca) ; l'association de ces deux techniques s'appelle un « double marquage ».

Un petit problème technique doit être résolu dans les expériences de double marquage. Il faut mesurer l'apparition d'une faible quantité de l'un des isotopes qui entre dans le compartiment au milieu d'une très grande quantité du second qui sert à suivre les flux en sens inverse. Un tel problème peut être résolu en tenant compte des différences dans les constantes physiques des deux isotopes utilisés. En effet de faibles quantités de ^{45}Ca ($T_{1/2} = 164$ jours) peuvent être mesurées sur des échantillons contenant de fortes quantités de ^{47}Ca ($T_{1/2} = 4,9$ jours) après décroissance de ce dernier. Un compteur de type G.M. est utilisé.

Les mesures dans le cas expérimental inverse (faible quantité de ^{47}Ca β : 0,68 MeV 80 % - 2 MeV 20 % et $\gamma = 1,31 - 0,48$ et 0,83 V) dans une forte quantité de ^{45}Ca ($\beta = 0,25$ MeV) sont réalisées d'une manière continue à l'aide d'un détecteur à scintillation spécialement construit pour cette opération (Istin, 1964). Ce scintillateur, associé à un photomultiplicateur et à un ensemble de comptage, permet de faire une discrimination entre les signaux qui ont pour origine le ^{47}Ca et d'éliminer par variation du seuil ceux dus au ^{45}Ca .

La figure 6 illustre les résultats obtenus au cours d'une expérience de double marquage. Au temps zéro, une solution de $^{45}\text{Ca Cl}_2$ est introduite dans le compartiment 1, figurant la cavité extrapalléale et une solution de $^{47}\text{Ca Cl}_2$ dans le compartiment 3.

2. - La mesure de flux de « décharge ».

Il est également possible de marquer le compartiment 2 par un contact préalable et prolongé du manteau avec l'indicateur nucléaire ; l'apparition du radioélément dans les compartiments 1 et 3 est alors suivie en fonction du temps. Expérimentalement, cette décharge est réalisée par un renouvellement continu des solutions se trouvant en contact avec les deux faces externes du manteau par d'autres solutions ne contenant pas d'indicateur nucléaire.

Ces deux types d'expériences peuvent être associés de manière à multiplier les informations sur un même morceau de manteau. En effet, le temps utilisé à la mesure des flux unidirectionnels, s'il est suffisamment long, peut être considéré comme une période de marquage du calcium du manteau préparant ainsi les expériences de décharge. Après 8 heures environ, pendant lesquelles les flux unidirectionnels sont mesurés, commence le rinçage des compartiments 1 et 3 avec des solutions sans indicateur nucléaire (fig. 7).

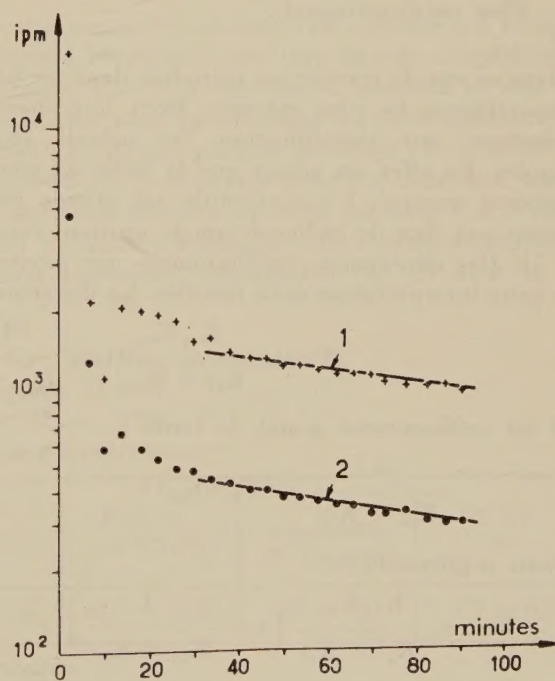


FIG. 7. — Expériences de décharge. La cinétique de sortie du radioélément à travers les deux épithéliums d'un manteau préalablement marqué est suivie en fonction du temps. L'épithélium situé contre la coquille (courbe 1) est 3,3 fois plus perméable au calcium que le deuxième épithélium (courbe 2) (d'après Istin, M. et J. Maetz, 1964).

Une interprétation mathématique est proposée pour permettre le calcul des coefficients de perméabilité à partir des résultats illustrés par les figures 6 et 7.

3. - Signification théorique des expériences.

Un calcul théorique rigoureux permet d'établir les trois équations décrivant les échanges dans un système de trois compartiments en série. L'équation qui définit les échanges en fonction du temps pour chaque compartiment doit faire apparaître la différence entre la quantité de radiocalcium qui entre et celle qui sort. Ces équations seront :

$$\frac{dx}{dt} = K_{21} y - K_{12} x$$

$$\frac{dy}{dt} = K_{12} x - K_{21} y - K_{23} y + K_{32} z$$

$$\frac{dz}{dt} = K_{23} y - K_{32} z.$$

Toutefois, au cours de la résolution de ce système, le calcul des constantes s'avère difficile dans les cas expérimentaux étudiés, aussi ne le développerons-nous pas ici. Seules seront présentées les approximations correspondant aux deux protocoles expérimentaux utilisés.

— Flux unidirectionnels.

Dans ce cas, le traceur est introduit dans un des compartiments les plus externes. Deux hypothèses permettant une simplification des calculs sont avancées. En effet, on admet que la taille du compartiment marqué, 1 par exemple, est grande par rapport aux flux de radiocalcium le quittant (voir fig. 5). Des expériences préliminaires ont montré que cette interprétation était justifiée. La deuxième

$$z = x_0 \frac{K_{12} K_{23}}{K_{21} + K_{23}} t + \frac{1}{K_{21} + K_{23}} e^{-(K_{21} + K_{23}) t} - \frac{1}{K_{21} + K_{23}}$$

Si t est suffisamment grand, le terme :

$$\frac{1}{K_{21} + K_{23}} e^{-(K_{21} + K_{23}) t}$$

devient négligeable et :

$$z = x_0 \frac{K_{12} K_{23}}{K_{21} + K_{23}} \left(t - \frac{1}{K_{21} + K_{23}} \right) \quad (2)$$

Cette équation est celle d'une asymptote à la courbe qui représente Z .

En posant $z = 0$, $t = \theta$ (point d'intersection de la droite avec l'axe des t), nous arrivons à partir

hypothèse est de considérer les départs du compartiment 3 vers le compartiment 2 comme négligeables pendant la durée de l'expérience, la taille relative des compartiments 2 et 3 et la grande dilution de l'indicateur nucléaire dans l'isotope stable du compartiment 3 permettent de l'avancer.

Dans ces conditions :

$$\frac{dy}{dt} = K_{12} x_0 - (K_{21} + K_{23}) y \quad (1)$$

avec

$$\text{— pour } t = 0 \quad y = 0$$

$$t \rightarrow \infty \quad y \rightarrow y \text{ équilibre} = \frac{K_{12} x_0}{K_{21} + K_{23}}$$

L'intégration de l'équation (1) donne :

$$y = x_0 \frac{K_{12}}{K_{21} + K_{23}} \left(1 - e^{-(K_{21} + K_{23}) t} \right)$$

D'autre part, l'équation représentant les variations dans le compartiment 3 sera limitée à :

$$\frac{dz}{dt} = K_{23} y$$

$$\text{— pour } t = 0 \quad \frac{dz}{dt} = 0$$

La pente de la courbe représentant $Z = f(t)$ est donc nulle à l'origine.

— pour $t \rightarrow \infty$, y tend vers y équilibre, et

$$\frac{dz}{dt} (\text{équilibre}) = \text{constante}$$

La valeur de z est donnée par :

de l'équation (2) à évaluer graphiquement la valeur de $K_{21} + K_{23}$, soit :

$$\theta = \frac{1}{K_{21} + K_{23}}$$

Il est également possible, d'après les portions rectilignes des courbes, de calculer K_{12} :

$$K_{12} = x_0 \frac{K_{21} + K_{23}}{K_{23}} \frac{z}{t - \theta}$$

(un calcul analogue permet d'obtenir la valeur de K_{32}).

— Flux de décharge :

Le protocole expérimental utilisé permet de considérer les compartiments 1 et 3 comme étant de taille infinie par rapport au compartiment 2. On peut ainsi négliger, pendant la durée de l'expérience, les retours de 1 et 3 vers 2. L'équation traduisant les variations de la quantité de traceur présente, en fonction du temps, dans 2 se réduira à :

$$\frac{dy}{dt} = -(K_{21} + K_{23}) y$$

ce qui donne :

$$y = y_0 e^{-(K_{21} + K_{23}) t} \tag{3}$$

On peut, à partir de cette équation, obtenir :

$$z = K_{23} y_0 e^{-(K_{21} + K_{23}) t} \tag{4}$$

$$x = K_{21} y_0 e^{-(K_{21} + K_{23}) t} \tag{5}$$

Le rapport des relations (4) et (5) montre que :

$$\frac{x}{z} = \frac{K_{21}}{K_{23}}$$

En coordonnées semi-logarithmiques, ces équations (4) et (5) sont représentées par deux droites parallèles de pente $(K_{21} + K_{23})$ (fig. 7). Il faut remarquer que la valeur du coefficient $(K_{21} + K_{23})$ a une signification biologique. C'est la constante de renouvellement, c'est-à-dire la fraction de y_0 [voir équation (3)] renouvelée par unité de temps. Elle permet le calcul de la période biologique* du calcium dans le manteau. La relation qui lie la constante de renouvellement $K = (K_{21} + K_{23})$ et la période T est :

$$K \cdot T = 0,69.$$

L'exploitation des courbes expérimentales qui viennent d'être présentées, apporte, à l'aide du modèle mathématique établi, un nombre appréciable d'informations qui sont résumées dans le Tableau II. Ce tableau met en valeur certains éléments

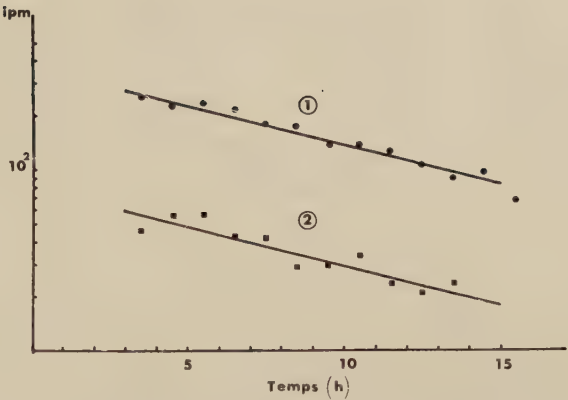


FIG. 8. — Expérience de décharge du compartiment lentement échangeable. Le manteau utilisé provient d'un animal ayant séjourné 5 jours dans un aquarium. Le calcium de l'eau contenue dans l'aquarium était marqué au ^{45}Ca . La période biologique de ce compartiment est de 6,5 heures.

ments positifs sur la connaissance du métabolisme du calcium mais il montre également les faiblesses du système à 3 compartiments. Parmi les résultats positifs nous retiendrons que :

- les épithéliums sont perméables dans les deux sens au calcium. L'épithélium situé contre la coquille est 3 fois plus perméable que celui limitant la cavité ;
- seuls 8,5 % du calcium total du manteau sont impliqués dans les échanges. Ce calcium, rapidement échangeable, a une période biologique de 1,9 heure.

Par contre, le schéma d'un système à 3 compartiments représente une trop grande simplification puisque 91,5 % du calcium du manteau ne sont pas impliqués dans les échanges. Le prolongement pendant une longue période de temps (14 heures) des expériences de décharge pour des manteaux venant d'animaux marqués *in vivo*, pendant 3 à 5 jours, fait apparaître l'existence d'un compartiment calcium lentement échangeable (fig. 8) dont la pé-

TABLEAU II
Valeur des coefficients de transfert K_{ij} , des flux de calcium F_{ij}
et de la période biologique ($T\ 1/2$).
(D'après Istin, M. et J. Maetz, 1964)
Moyenne $\pm$ E.S. pour cinq expériences

$K_{21} + K_{23}^*$	$K_{21} + K_{23}^{**}$	$\frac{K_{21}}{K_{23}}$	$F_{12} = F_{21}$ ($\mu\text{g/h/cm}^2$)	$F_{23} = F_{32}$ ($\mu\text{g/h/cm}^2$)	Ca échangeable (% Ca total)	T $1/2$ (h)
$0,039 \pm 0,006$	$0,036 \pm 0,006$	$3,0 \pm 0,55$	$9,6 \pm 3,58$	$30,2 \pm 14,35$	$8,5 \pm 3,1$	$1,9 \pm 0,5$
* ($K_{21} + K_{23}$) obtenu à partir des courbes de double marquage. ** ($K_{21} + K_{23}$) obtenu à partir des courbes de décharge.						

* Une période biologique est définie par analogie avec une période physique de désintégration d'un radioélément. Elle correspond au temps au bout duquel 69 % du compartiment aurait été renouvelés dans un système à l'état stationnaire. Cette relation est obtenue à partir de $y = y_0 e^{-Kt}$ en calculant y et $y/2$ pour les valeurs t_1 et t_2 telles que $t_1 - t_2 = T$.

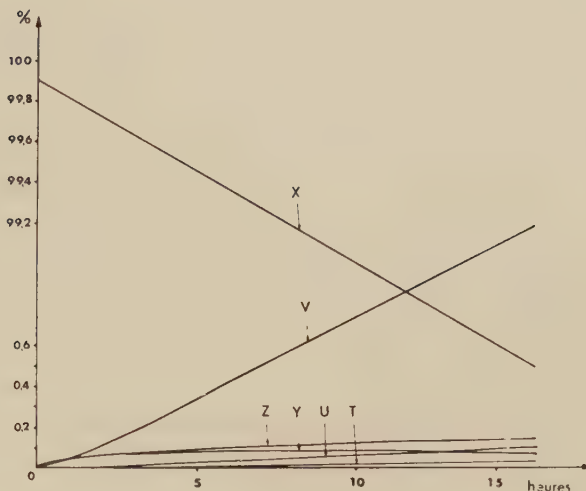
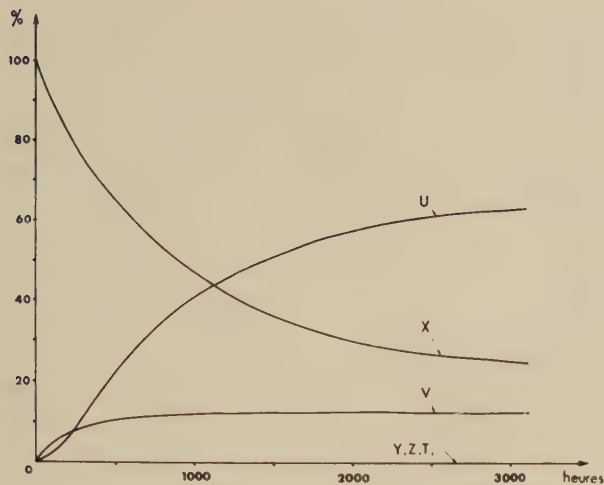


FIG. 11. — Expérience analogue à la mesure d'un flux unidirectionnel conduite à l'aide d'une calculatrice électronique analogique. En abscisse, le temps en heures ; en ordonnées la quantité de radiocalcium dans les différents compartiments en % de la dose initiale introduite dans le compartiment (1) au temps zéro. A gauche, expérience poursuivie jusqu'à l'obtention de l'équilibre. A droite, extension des échelles pour le début de l'expérience. Les courbes obtenues doivent être comparées à celles présentées sur les figures 6 et 7. Les coefficients de transfert du calcium d'un compartiment vers l'autre (K_{ij}) sont directement lus sur la machine (d'après Istin, M., 1968).

4. - Etude du manteau dans un état non stationnaire.

Le manteau est monté entre des chambres et baigné sur ses deux faces par des solutions de même pression osmotique. Celle placée du côté coquille ne contient pas de calcium, l'autre a une concentration de 2 mEq/l, ce qui correspond à la teneur moyenne de l'eau dans laquelle vivait l'animal. De l'air est utilisé pour brasser la solution côté cavité et du carbogène dans l'autre chambre. Les concentrations du calcium sont suivies en fonction du temps dans les deux solutions (fig. 12).

Il est intéressant de noter que :

- l'épithélium côté cavité n'est le siège d'aucun flux net du calcium alors que cet élément le

traverse dans les deux sens comme l'ont montré les expériences effectuées avec les indicateurs nucléaires ;

- une augmentation importante, en fonction du temps, de calcium total est mise en évidence du côté coquille. Elle tend vers une valeur limite. Cet apport ne peut trouver sa source que dans les propres réserves du manteau.

Cette expérience pose le problème de l'utilisation des réserves du calcium. Il sera étudié dans la suite de cet article. Toutefois il sera précédé par la présentation d'un autre abord expérimental susceptible de fournir de précieuses indications sur les échanges au niveau des membranes. L'étude électrophysiologique qui suit en retrace les principaux aspects.

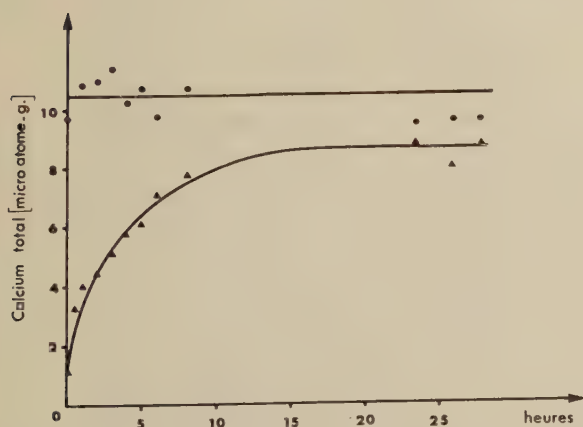


FIG. 12. — Courbe cumulative de l'apparition du calcium côté coquille (▲) pour un manteau en état non stationnaire. Ce calcium provient des réserves du tissu. Aucun flux net n'est détecté du côté de la cavité (●). Le protocole expérimental est présenté dans le texte (expérience effectuée en collaboration avec B. Fossat).

B) Étude électrophysiologique du manteau.

(D'après ISTIN et KIRSCHNER, 1968 ;
ISTIN et GIRARD, 1970c ;
ISTIN et col., 1970)

Les potentiels bioélectriques apparaissent généralement comme une conséquence de mouvements ioniques. Ils sont dus soit à la diffusion passive, soit à un transport actif d'ions. Ainsi l'étude d'un potentiel bioélectrique peut apporter d'intéressantes informations sur la nature de ces mouvements.

1. - Influence de la concentration du calcium sur les différences de potentiel électrique.

Entre les faces externe (côté coquille) et interne du manteau, une différence de potentiel électri-

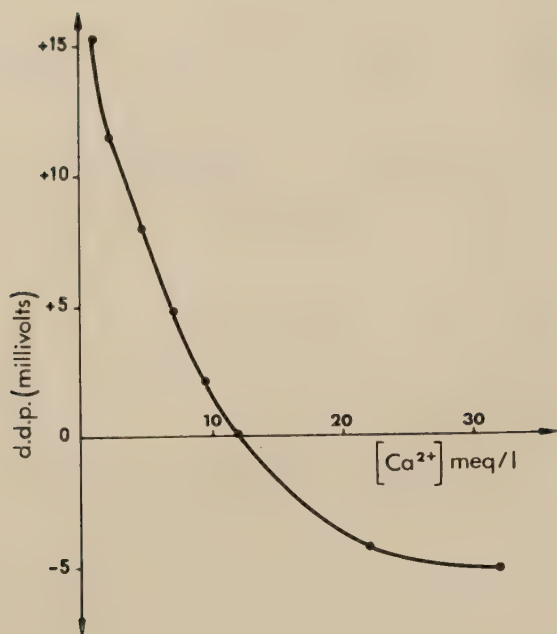


FIG. 13. — Variations de la valeur de la différence de potentiel ($\varphi_0 - \varphi_1$) en millivolts en fonction des concentrations du calcium (mM). Des solutions identiques baignent les deux épithéliums d'un manteau de moule. Pour une concentration du calcium voisine de celle de l'hémolymphe, la d.d.p. est nulle (d'après Istín, M. et J. Maetz, 1964).

que E peut être mesurée. La polarité de ce potentiel est constante : positive côté coquille. Sa valeur est dépendante de la concentration de l'ion calcium dans les solutions baignant les faces externe et interne du manteau (fig. 13). D'autre part le calcium passant facilement à travers le manteau, il était intéressant, dans ces conditions, d'étudier la relation entre la mobilité du calcium et l'électrogenèse. Toutefois la figure 3 montre que le manteau est une structure complexe et que le calcium doit traverser au moins 4 membranes cellulaires pour passer d'une chambre dans l'autre. Il est donc nécessaire d'étudier le profil électrique du manteau pour pouvoir déterminer le site de l'électrogenèse. L'étude d'un tel profil au travers d'un épithélium fait généralement appel à une technique utilisant des microélectrodes que l'on enfonce dans les cellules. Ces microélectrodes sont préparées à partir d'un mince tube de verre (0,7 mm) étiré de manière à obtenir une pointe d'un diamètre inférieur à 1μ , ce qui est petit par rapport à la taille d'une cellule (50 à 100μ). Ces microtubes de verre sont remplis de KCl 3M et leur résistance électrique varie de 10 à 15 mégohms. Les microélectrodes sont montées sur un micromanipulateur permettant de très faibles déplacements verticaux. Elles sont reliées par un fil de platine à un préamplificateur (cathode follower) et à un amplificateur (Medistor A 35) dont la résistance d'entrée est de 500 mégohms. Le manteau dont on étudie le profil de potentiel est serré entre deux chambres verticales (fig. 14); il sépare ainsi la solution saline artificielle, placée dans la chambre inférieure, de celle

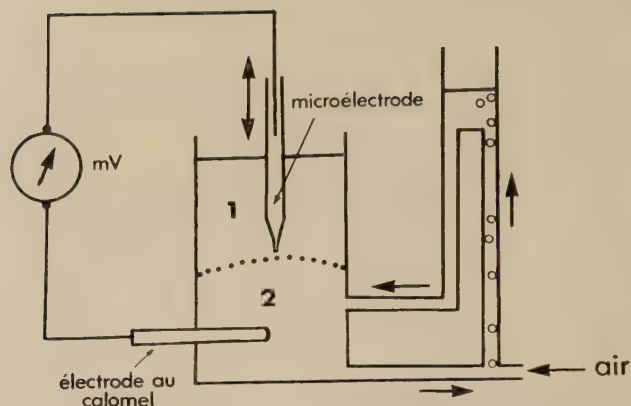


FIG. 14. — Schéma du montage utilisé pour la mesure du profil électrique du manteau des moules avec une microélectrode. Le manteau est serré entre les chambres 1 et 2. Une circulation est effectuée dans ces chambres par des circuits latéraux. m = microélectrode, c = électrode de référence.

de la chambre supérieure. La microélectrode est alors enfoncée par la chambre supérieure vers la chambre inférieure dans laquelle est également introduite une électrode de référence. Les lectures permettant l'établissement du profil de potentiel sont effectuées en remontant la microélectrode.

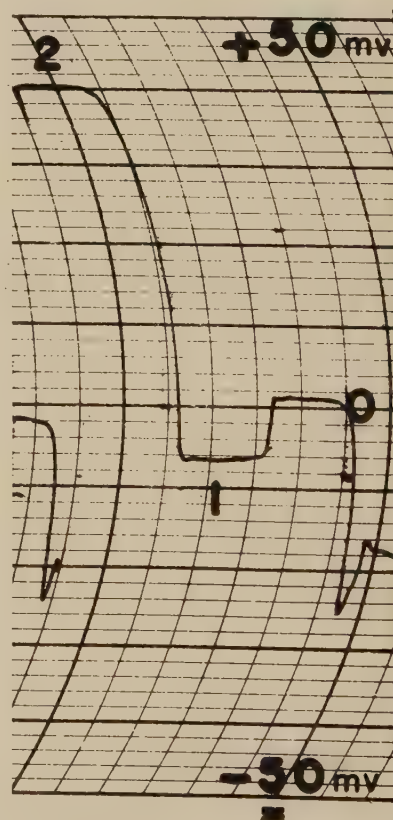


FIG. 15. — Potentiels de membrane d'une seule couche de cellules épithéliales côté coquille. Une solution contenant 2,4 mEq/l de calcium baigne les deux faces de l'épithélium. Le schéma expérimental est présenté sur la figure 14 (d'après Istín, M. et L.B. Kirschner, 1968).

Cette technique est délicate à utiliser. Elle fait appel à un matériel fragile et des phénomènes électriques parasites prennent naissance à l'extrémité de la pointe de l'électrode. Il est également difficile de multiplier les mesures sur un même morceau de tissu. C'est toutefois une technique de référence, elle est essentiellement utilisée comme contrôle (fig. 15) d'une technique suggérée par Janaček (1962) et beaucoup plus simple à mettre en œuvre pour les études générales. Le manteau est monté entre des chambres de plexiglass telles que celles décrites sur la figure 16. Des ponts d'agar-agar sont plongés dans chacune des solutions et connectés par l'intermédiaire d'électrodes au calomel à un potentiomètre. Au serrage, un morceau de tissu est laissé libre sous les chambres. Ce morceau du manteau baigne dans une solution saline, elle-même reliée à un potentiomètre par l'intermédiaire d'une électrode au calomel (fig. 16). Un commutateur permet la mesure de la d.d.p. entre l'une quelconque des électrodes groupées par paires. Ainsi les deux électrodes baignant dans les chambres en plexiglass permettent la mesure de la d.d.p. totale à travers le manteau. Cette d.d.p. totale se décompose en deux d.d.p. partielles, mesurées entre l'une ou l'autre des électrodes plongées dans les solutions emplissant les chambres et l'électrode commune en contact avec le tissu (voir fig. 16). Cette d.d.p. totale représente la somme algébrique des d.d.p. partielles. Des justifications expérimentales sont apportées à la validité de cette technique par Istín et Kirschner (1968). Elle permet d'obtenir facilement non seulement le profil de potentiel mais encore les modifications apportées à ce profil par un changement de la concentration du calcium du côté de la coquille (fig. 17), la concentration côté cavité restant constante. La figure 18 illustre l'expérience inverse.

Une étude similaire peut être effectuée avec une couche de cellules épithéliales obtenue à partir du

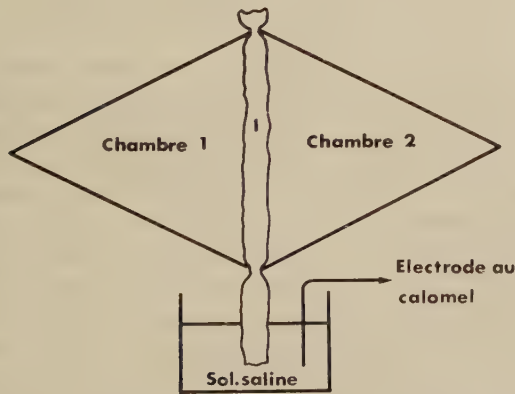


FIG. 16. — Schéma du montage utilisé pour la mesure des d.d.p. transépithéliales ou transmembranaires avec un système à 3 électrodes. Une électrode commune est en contact avec le tissu par l'intermédiaire d'une solution saline. Deux autres électrodes (non représentées) trempent dans les chambres 1 et 2. 1 = région interstitielle du manteau.

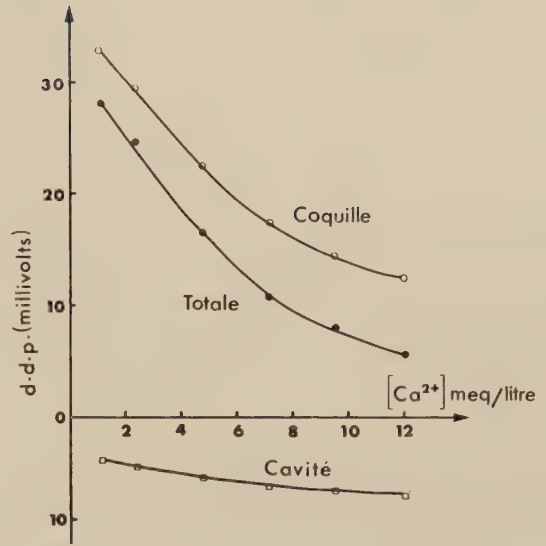


FIG. 17. — Effet du calcium sur les différences de potentiel transépithéliales et totale du manteau. En abscisse, la concentration du calcium ionique dans la solution baignant l'épithélium côté coquille seulement. Côté cavité, la concentration est maintenue à sa valeur initiale pendant toute la durée de l'expérience (d'après Istín, M. et L.B. Kirschner, 1968).

manteau par microdissection. Pour cela, le tissu est fixé sur une plaque de cire. Le tout est trempé dans une solution physiologique aérée. Sous loupe binoculaire, l'épithélium supérieur du manteau est enlevé avec soin, tout en prenant garde de ne pas altérer les cellules de l'épithélium inférieur. Une surface de 3 à 4 cm² peut être dégagée par cette technique en 30 minutes environ. De tels épithéliums isolés sont montés entre des chambres comme un manteau entier. Il est ainsi possible d'étudier le profil électrique d'une couche de cellules épi-

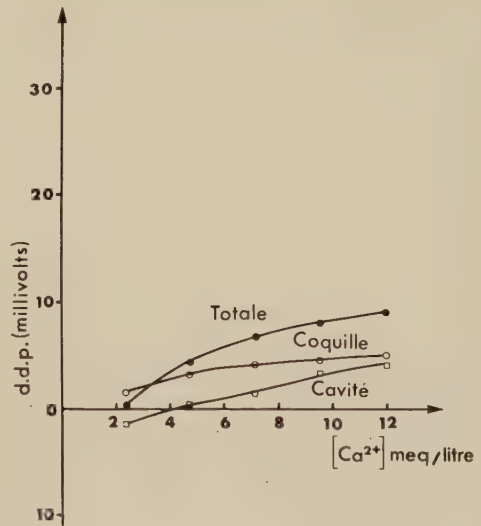


FIG. 18. — Effet du calcium sur les différences de potentiel transépithéliales et totales du manteau. La concentration initiale du calcium est de : 2,4 mEq/l du côté de la cavité ; cette concentration est modifiée au cours de l'expérience (abscisse). Du côté coquille elle est maintenue à 12 mEq/l pendant la durée de l'expérience (d'après Istín, M. et L.B. Kirschner, 1968).

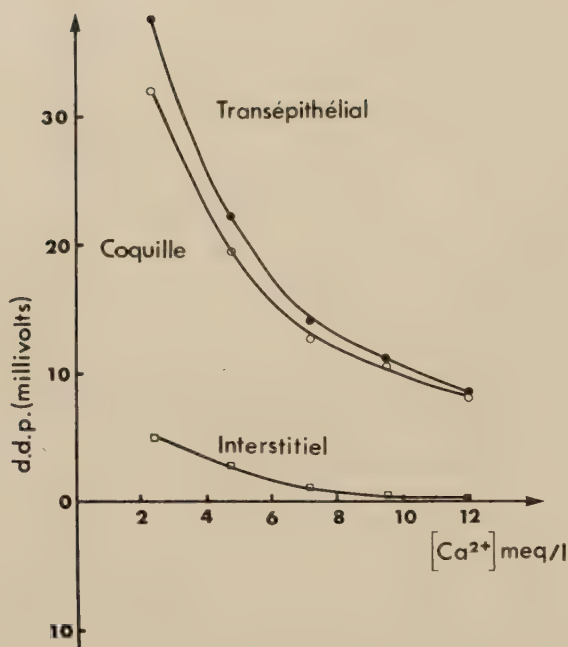


FIG. 19. — Effet du calcium sur les différences de potentiel transépithéliales et transmembranaires d'un épithélium côté coquille isolé. Seule la concentration du calcium ionique côté coquille est modifiée pendant l'expérience. Côté interstitiel, la solution saline contient 12 mEq/l de Ca⁺⁺.

théliales. La figure 19, pour l'épithélium situé contre la coquille, illustre les variations de la d.d.p. en fonction des variations de la concentration du calcium dans la solution baignant la membrane la plus externe. La concentration de la solution en contact avec le tissu interstitiel est maintenue à 12 mEq/l. Une étude similaire est présentée sur la figure 20 pour l'épithélium limitant la cavité.

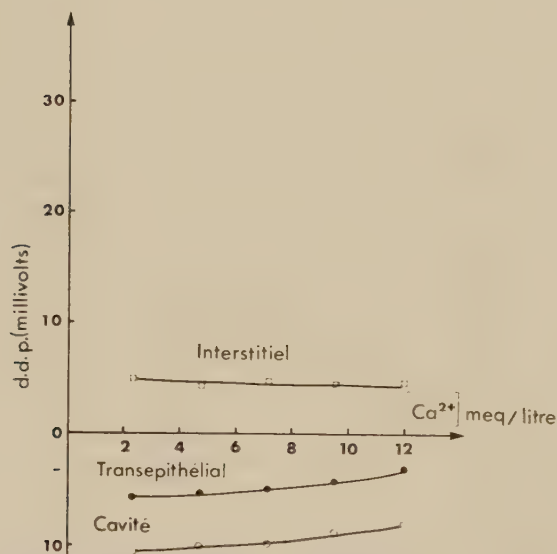


FIG. 20. — Effet du calcium sur les différences de potentiel transépithéliales et transmembranaires d'un épithélium côté cavité isolé. La concentration du calcium ionique est modifiée pendant l'expérience. Elle est maintenue constante du côté interstitiel (12 mEq/l).

La concentration du calcium n'est modifiée que dans la chambre simulant la cavité.

Des résultats sont présentés sur les figures 17 à 20 et un certain nombre d'observations intéressantes s'en dégagent. Parmi celles-ci, nous retiendrons que :

- la différence de potentiel totale à travers le manteau trouve essentiellement son origine au niveau de l'épithélium responsable de la sécrétion de la coquille ;
- dans cet épithélium, c'est la membrane la plus externe, en contact avec la coquille qui est responsable du potentiel bioélectrique ;
- cette différence de potentiel varie de 29 mV pour un changement d'un facteur 10 dans les concentrations du calcium. Cette valeur est très importante parce qu'elle correspond à la valeur théorique due à un potentiel de diffusion qu'il serait possible de calculer à partir de l'équation de Nernst (6) pour un rapport des activités chimiques de 10 de part et d'autre de la membrane perméable au calcium.

$$\psi_{\text{coq}} - \psi_{\text{coq}} - \psi_{\text{cav}} = E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{\text{cav}}}{a_{\text{coq}}} \quad (6)$$

a_{cav} et a_{coq} sont les activités intracellulaires et extracellulaires du calcium ionique qui peuvent être confondues avec les concentrations. E est la d.d.p. électrique. Les autres symboles ont leur signification habituelle. L'application de cette relation théorique à la membrane montre que l'anion doit avoir très peu d'importance. Cette membrane se comporte donc comme celle d'une « électrode à calcium ».

2. - Profil électrique fonctionnel en rapport avec les mouvements passifs du calcium.

Pour l'étude de ce profil, une modification est apportée à la technique utilisée pour l'expérience présentée sur la figure 15. Le micromanipulateur, sur le bras duquel est fixée la microélectrode qui doit traverser le tissu, est entraîné d'une manière régulière à l'aide d'un moteur dont on peut modifier la vitesse de rotation. Des vitesses linéaires de déplacement de la pointe de la microélectrode à travers le manteau sont fixées dans la gamme de 40 à 80 μ /minute. La figure 21 illustre le profil obtenu dans ce cas expérimental.

L'observation de ce profil permet deux remarques importantes. La première est qu'un remplacement privilégié, correspondant à un espace hémolympatique, est choisi à la loupe binoculaire pour

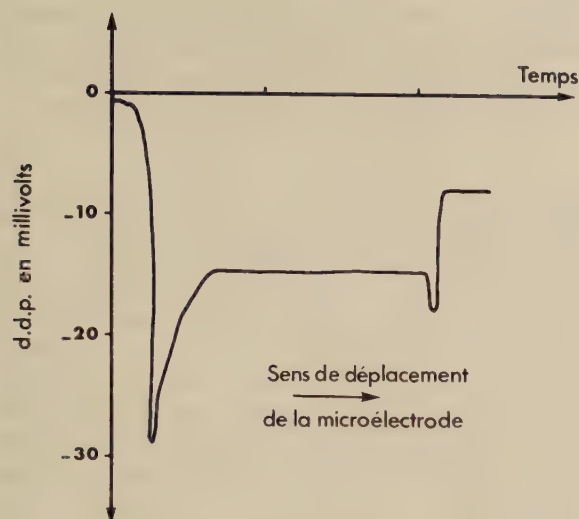


FIG. 21. — Profil du potentiel bioélectrique du manteau. Le montage expérimental est celui schématisé sur la figure 14. Au départ, les deux électrodes sont dans la même chambre, la d.d.p. est nulle. En remontant la microélectrode, le premier saut de potentiel (-30 mV) correspond à son entrée dans une cellule épithéliale côté coquille. Le deuxième saut (15 mV) est dû à la sortie de la cellule vers la partie interstitielle. Dans ce tissu, la microélectrode ne traverse pas de cellules, la d.d.p. est constante. Une nouvelle chute du potentiel de -3 mV correspond à l'entrée dans une cellule de l'épithélium côté cavité, le dernier saut (10 mV) traduisant la sortie de la microélectrode du tissu (d'après Istín, M. et col., 1970).

l'expérience. Ce choix limite les sauts de potentiel à 4 en éliminant les modifications du profit qu'aurait entraîné le passage de la microélectrode dans des cellules du tissu interstitiel. La deuxième remarque, peut-être plus importante, est l'observation de la lente modification de la d.d.p. quand l'électrode traverse la membrane basale des cellules épithéliales, côté coquille. Notons dès à présent que cette membrane fixe une quantité importante de calcium comme on le montrera par la suite (voir chapitre III, fig. 42).

3. - Influence du CO_2 et du bicarbonate sur la différence de potentiel du manteau.

L'interdépendance qui existe entre la valeur de la différence de potentiel bioélectrique du manteau et la concentration de l'ion calcium a été mise en évidence par les expériences rapportées ci-dessus. Kirschner (1962) a montré que le sodium et le potassium ne participaient à l'électrogenèse mais que le strontium et le baryum avaient, à des concentrations qui ne sont toutefois pas physiologiques, une action voisine de celle du calcium. Une autre molécule a également une influence très importante sur la d.d.p. En effet, le manteau développe une différence de potentiel beaucoup plus grande quand les solutions qui le baignent sont

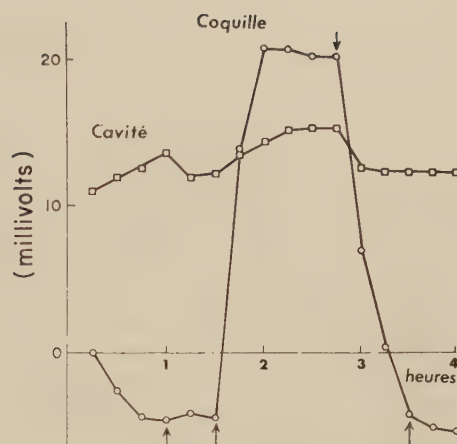


FIG. 22. — Effet du bicarbonate et du CO_2 dissous sur les différences de potentiel partielles d'un manteau entier. Les détails expérimentaux sont donnés dans le texte (d'après Istín, M. et L.B. Kirschner, 1968).

gazées avec du carbogène plutôt qu'avec de l'air ou de l'oxygène. Ce phénomène apparaît sur la figure 22. Notons que, seul, le changement de la tension partielle du CO_2 entraîne une variation rapide de la d.d.p. Une modification de la concentration des bicarbonates reste sans effet.

Cette dépendance de la différence de potentiel avec la tension partielle du CO_2 est étudiée en utilisant des mélanges de gaz carbonique et d'oxygène dont les proportions relatives peuvent être modifiées. La d.d.p. augmente d'une manière non linéaire avec la tension partielle du CO_2 comme cela ressort de la figure 23. Elle tend vers une valeur limite quand cette tension atteint 4,5 à 5 %. Si les résultats expérimentaux sont portés en inverse ($1/\text{mV}$ et $1/\%$ CO_2), une droite est obtenue (fig. 23). Un tel changement dans l'allure de la courbe suggère généralement qu'un phénomène enzymatique est impliqué dans la réaction*.

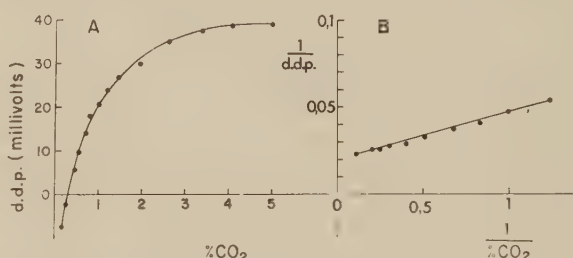


FIG. 23. — Effet de la tension partielle du CO_2 sur la différence de potentiel d'un manteau de moule. A gauche, les concentrations du calcium des solutions baignant les deux épithéliums sont identiques ($4,0$ mEq/l). Les deux solutions sont aérées par des mélanges d'oxygène et de CO_2 (d'après Istín, M. et L.B. Kirschner, 1968). A droite, les résultats sont portés en inverse. L'obtention d'une ligne droite, indice d'une fonction hyperbolique, suggère l'intervention d'un mécanisme enzymatique liant le mode d'action du CO_2 aux concentrations du calcium responsables de la d.d.p.

* En effet, les cinétiques enzymatiques sont généralement bien représentées par des fonctions hyperboliques permettant de suivre la vitesse de la réaction en fonction des quantités de substrat mises en jeu.

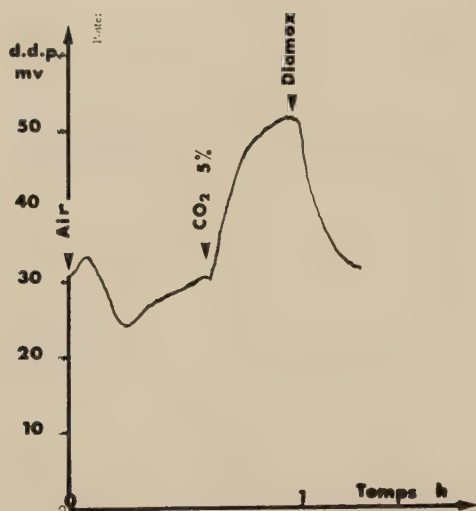


FIG. 24. — Effets du CO_2 et du diamox sur la valeur du potentiel bioélectrique du manteau de la moule d'eau douce. Les détails sont donnés dans le texte (d'après Istin, M. et J.P. Girard, 1970b).

Un enzyme se trouve en assez grande quantité dans les tissus des lamellibranches ; c'est l'anhydrase carbonique (Florkin et De Marchin, 1941). Il catalyse les réactions d'hydratation et de déshydratation du CO_2 . Il est puissamment inhibé par une sulfamide : le diamox (5-acétamide-1,3,4,thio-diazole-2-sulfonamide).

4. - Action d'un inhibiteur de l'anhydrase carbonique sur le potentiel bioélectrique.

L'action enzymatique de l'anhydrase carbonique, suggérée dans le paragraphe précédent, est illustrée de manière beaucoup plus frappante par les résultats présentés sur la figure 24. Pendant toute la durée de l'expérience, les solutions en contact avec les deux faces externes des épithéliums ne sont pas changées. Leurs compositions sont identiques et la d.d.p. est positive du côté de la coquille. Au départ, le contenu des deux chambres est gazé avec de l'air. La d.d.p. varie peu pendant la première période ; elle est de l'ordre de 24 mV. Après cette mise à l'équilibre de la préparation, l'oxygène est remplacé par un mélange O_2 : 95 %- CO_2 : 5 %. La d.d.p. augmente immédiatement pour atteindre une nouvelle valeur d'équilibre de 52 mV. Une solution concentrée de diamox est ajoutée du côté coquille pour que la concentration finale dans la chambre soit de $1 \times 10^{-3}\text{M}$. Cette concentration entraîne une baisse immédiate de la valeur de la d.d.p. qui se trouve alors ramenée à sa valeur de départ. Cette dernière expérience permet de faire les deux remarques suivantes :

- La vitesse avec laquelle varie la d.d.p. lorsque du CO_2 est dissous dans les solutions baignant le tissu montre que la diffusion de ce gaz vers le site d'action de l'enzyme est très rapide.
- Une hypothèse peut être proposée à ce stade de la présentation des résultats pour expliquer l'origine des variations de potentiel liées aux changements de la tension partielle du CO_2 dans les solutions. Wilbur et Jodrey (1955) ont montré sur des huîtres l'action inhibitrice du diamox sur les dépôts du calcium dans la coquille. Cette observation suggère la nature du lien unissant le métabolisme du calcium à celui du CO_2 dans lequel intervient l'anhydrase carbonique. Le CO_2 par une action *indirecte* amènerait des modifications de la concentration du calcium ionique dans les liquides du manteau. Ce phénomène serait le seul responsable des variations de la d.d.p. Les changements de concentration du calcium à l'intérieur du manteau ne se feraient que grâce à des échanges, dans les deux sens, entre les compartiments 3 (calcium ionique rapidement échangeable) et 6 (compartiment lentement échangeable) de la figure 9. Cette hypothèse va se trouver vérifiée par les expériences présentées dans le prochain chapitre.

II. — MOBILISATION DES RÉSERVES DU CALCIUM

D'après M. ISTIN et J.-P. GIRARD, 1970 a,b,c

Le chapitre précédent a fait ressortir les mécanismes régissant les mouvements du calcium ionique à travers les membranes des cellules épithéliales du manteau. L'étude qui suit porte sur la nature des échanges entre le compartiment de réserve du calcium (compartiment 6 de la figure 9) et le calcium ionique (compartiment 3 de la figure 9). Il apparaîtra d'ailleurs que ces échanges ne se font plus à travers une membrane cellulaire, mais par l'intermédiaire d'une réaction biochimique, montrant ainsi le sens large qui doit être attribué à la notion de compartiment.

A) État dynamique des réserves du calcium.

Des morceaux de tissus provenant de plusieurs animaux sont homogénéisés pendant une minute à l'aide d'un broyeur cellulaire. Ce broyat est maintenu à 4°C^* pendant la suite des expériences. Des

* Cette température est choisie pour éviter les développements de micro-organismes dans les échantillons, développements qui fausseraient les résultats.

aliquotes du broyat sont réparties dans des récipients et gazées soit avec de l'air débarrassé de CO_2 par passage dans des flacons laveurs remplis d'eau distillée, soit avec un mélange oxygène 95 % - CO_2 5 % (« carbogène »).

Des échantillons de 0,5 ml sont prélevés dans chacune des aliquotes à intervalles de temps réguliers. Après centrifugation à $2\,000 \times g$ pendant 5 minutes, la concentration en calcium du surnageant est mesurée avec une électrode spécifique sensible à la seule forme ionisée du calcium (Thompson et Ross, 1966). L'électrode est reliée à un millivoltmètre électronique. Les dosages du calcium total sont effectués par photométrie de flamme après minéralisation des échantillons par l'acide nitrique à chaud. Les pH sont mesurés sur les surnageants des échantillons à l'aide d'une microélectrode de verre thermostabilisée.

1. - Relation entre la valeur du pH et la concentration du calcium ionique dans les homogénats.

Dans l'expérience illustrée par la figure 25, deux fractions aliquotes d'un même homogénat sont gazées l'une avec de l'air débarrassé de tout gaz car-

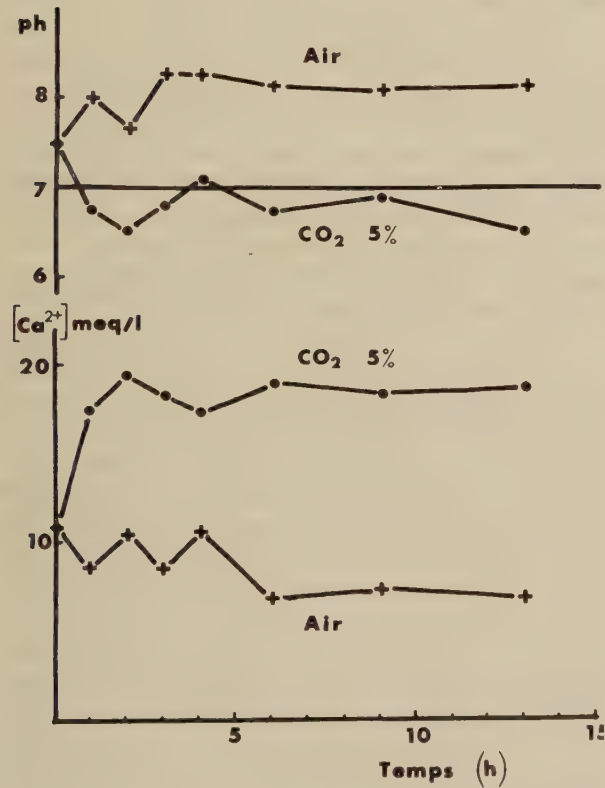


FIG. 25. — Variations en fonction du temps du pH et de la concentration du calcium dans les homogénats de manteau de moule. L'un des échantillons est gazé avec de l'air débarrassé de tout CO_2 (+), l'autre avec un mélange O_2 — 95 %, CO_2 — 5 % (d'après Istín, M. et J.P. Girard, 1970b).

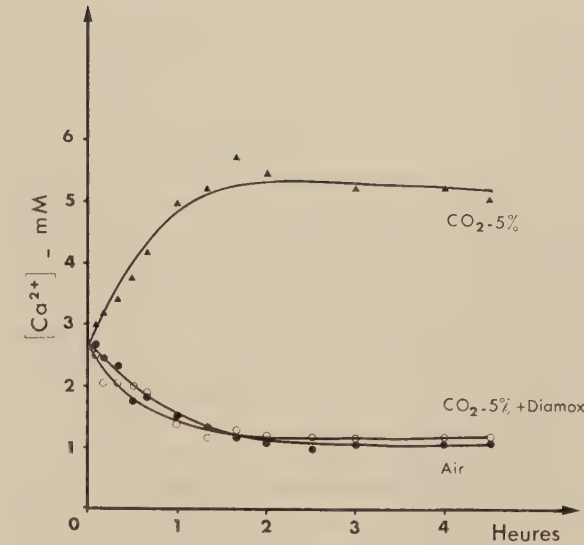


FIG. 26. — Variations en fonction du temps de la concentration du calcium ionique de trois fractions d'un même homogénat de manteau de moule. Ces fractions sont gazées avec de l'air sans CO_2 (▲), avec du carbogène (●) et du carbogène après addition d'un puissant inhibiteur de l'anhydrase carbonique : le diamox (○) (d'après Istín, M. et J.P. Girard, 1970b).

bonique, l'autre avec un mélange de carbogène. Les variations du pH et de la concentration du calcium ionique sont suivies en fonction du temps. Cette figure montre que si en présence d'air, la concentration du calcium reste constante ou diminue très lentement, elle augmente assez rapidement en présence de carbogène pour atteindre, après une heure, une valeur double de la concentration initiale. De plus, toute variation de pH est accompagnée d'un changement dans les concentrations du calcium pouvant laisser supposer l'existence d'une corrélation simple entre ces deux paramètres. La série d'expériences suivantes montre qu'il n'en est pas exactement ainsi.

2. - Rôle de l'anhydrase carbonique sur la mise en solution des réserves de calcium.

Un homogénat de tissu préparé comme dans l'expérience précédente est fractionné. La première fraction est gazée par de l'air dépourvu de CO_2 . Les deux autres, dont une contient du diamox (sous sa forme sodique), sont gazées à l'aide du mélange O_2 — 95 %, CO_2 5 %.

La figure 26 permet de suivre en fonction du temps les variations de la concentration du calcium dans les 3 préparations. Alors que cette concentration augmente assez rapidement dans la fraction gazée au carbogène pour atteindre la valeur de 5,20 millimoles au bout d'une heure et demie, la concentration du calcium ionique dans les deux autres préparations diminue lentement tout au long de l'expérience qui dure 5 heures.

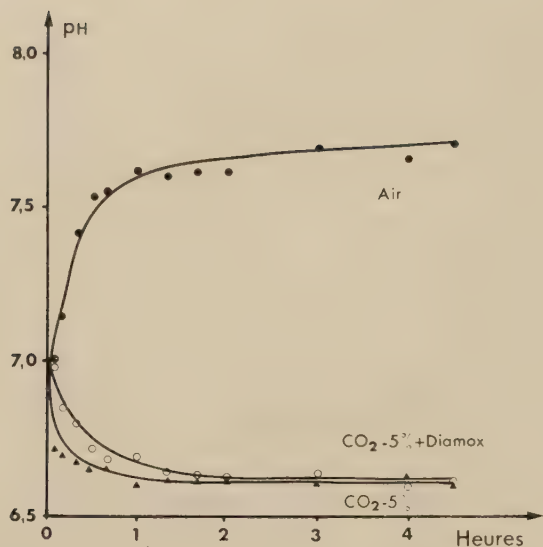
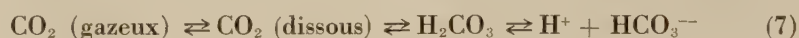


FIG. 27. — Variations en fonction du temps du pH d'homogénats de manteau de moule. Le protocole et les symboles sont ceux décrits pour la figure 3 (d'après Istin, M. et J.P. Girard, 1970b).

Pour ces mêmes préparations, les variations de pH peuvent être suivies sur la figure 27. Le pH



Cette relation montre que, dans un homogénat, le barbotage d'air (dépourvu de CO_2) entraîne la diminution du taux de CO_2 dissous. Tous les équilibres sont déplacés vers la gauche. Il y a par conséquent une diminution du nombre des ions H^+ et une alcalinisation du milieu. Au contraire, le barbotage d'un gaz contenant du CO_2 déplace les équilibres vers la droite, l'homogénat s'acidifie.

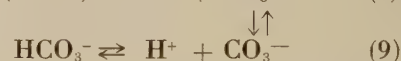
Toutefois l'équation (7) est insuffisante pour décrire complètement le système. Rappelons que les réserves de calcium dans le manteau sont très importantes (voir tableau III). Dans le cas le plus défavorable (Anodonte), il existe environ 10 fois plus de calcium sous forme insoluble que sous forme soluble. Pour de nombreux auteurs (voir Manigault, 1960 et Wilbur, 1964), ces réserves sont constituées chez les mollusques par des cristaux de CaCO_3 . On peut donc expliquer les échanges

de l'échantillon gazé à l'air varie lentement et régulièrement dans le sens d'une alcalinisation du milieu. Au contraire, les deux autres fractions gazées par barbotage de carbogène ont en fin d'expérience un pH voisin et légèrement acide. La valeur de ce pH (6,63) est différente de la valeur de départ (6,98).

Les phénomènes illustrés par les figures 26 et 27 sont réversibles.

Un certain nombre de conclusions se dégagent de ces expériences. Il faut noter que les homogénats de manteau sont riches en calcium (carbonates et bicarbonates) comme cela apparaît sur le tableau III. De plus, une importante fraction du tissu est de l'hémolymphe, riche en CO_2 et sursaturée en calcium par rapport au CO_2 (Potts, 1954). L'apparition ou la disparition du Ca^{++} et du CO_2 de la phase aqueuse de l'homogénat joue ainsi un rôle de premier plan sur les variations du pH. La relation générale illustrant l'équilibre entre les diverses formes du CO_2 dans un tel système peut se schématiser de la façon suivante :

entre les deux compartiments calcium de l'homogénat par les relations suivantes qui devront compléter l'équation (7) :



Ceci suppose que les ions carbonates réagissent avec les ions hydrogènes pour former des bicarbonates jusqu'à ce que le déplacement des équilibres vers la droite entraîne une reprécipitation en carbonate de calcium, le produit de solubilité de celui-ci ayant été atteint.

Les 3 relations précédentes permettent d'expliquer les changements de pH, liés aux variations de la $p\text{CO}_2$, qui apparaissent dans les broyats de tissus en cours d'expérience. Ils laissent aussi prévoir une corrélation entre le pH et la concentration du calcium ionique. Cette corrélation suggérée par l'enantiomorphisme (image l'une de l'autre dans un miroir) des courbes de la figure 25 est illustrée avec plus de rigueur par la figure 28. Sur cette dernière, les valeurs du pH et de $[\text{Ca}^{++}]$ mesurées, dans le cas d'un gazage à l'air, au cours des expériences précédentes, sont portées l'une par rapport à l'autre (courbe A). Le CO_2 dissous dans la préparation en début d'expérience est lentement entraîné par le barbotage de l'air. Le pH et la concentration du calcium ionisé sont modifiés. La fonction qui relie les 2 paramètres est linéaire et l'équation de la droite de corrélation déterminée à partir de 5 expériences est :

TABLEAU III

Composition des homogénats
de la partie centrale du manteau d'Anodonte
(moyenne pour 10 expériences)
D'après M. Istin et J.-P. Girard, 1970b

$\% \cdot \text{CO}_2$ $\pm \text{E.S.}$	$\frac{\text{CO}_2 \text{ total}}{\text{CO}_2 \text{ dissous}}$	$\frac{[\text{Ca}^{++}]}{\text{mM/l} \pm \text{E.S.}}$	$\frac{\text{Ca total}}{[\text{Ca}^{++}]}$
$4,09 \pm 0,08$	5,93	$2,97 \pm 0,25$	10,4

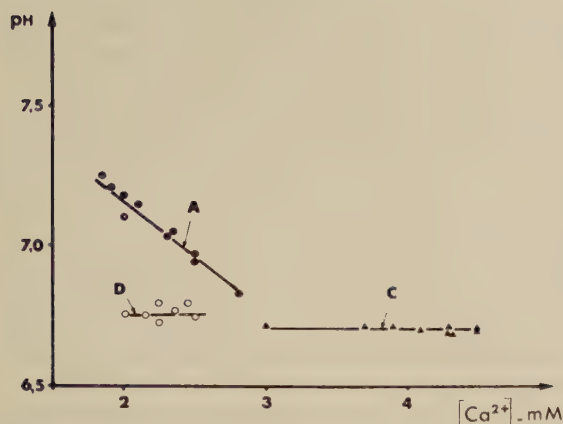


FIG. 28. — Courbes illustrant la corrélation pH — $[Ca^{2+}]$ pour la mise en solution des réserves de calcium dans un homogénat de manteau de moule. (Les symboles sont les mêmes que ceux utilisés pour la figure 26) (d'après Istín, M. et J.P. Girard, 1970b).

$pH = 7,93 (\pm 0,13) - 0,247 (\pm 0,03) [Ca^{++}]$ (10)
 Pour la même série d'expériences, la valeur du coefficient de corrélation est :

$$r = -0,90 \pm 0,04$$

Chaque point de la droite de corrélation représente la concentration maxima du calcium ionisé dans l'homogénat pour un pH déterminé. De plus, toutes les relations décrites au début de ce chapitre sont équilibrées et leurs vitesses sont négligeables devant l'élimination du CO_2 de la solution dans les conditions expérimentales. La droite A de la figure 28 peut donc être considérée comme correspondant à la variation de la solubilité du carbonate de calcium dans le milieu étudié.

Quand l'homogénat est gazé par le mélange O_2 95 % - CO_2 5 %, il n'est plus possible de trouver une corrélation entre la valeur du pH et celle de la concentration du calcium ionique (fig. 28, courbe C). Le même phénomène s'observe en présence de diamox (courbe D), les concentrations de calcium ionique étant inférieures dans ce cas pour des valeurs de pH identiques. C'est la présence d'importantes quantités d'anhydrase carbonique dans la préparation qui permet de mieux expliquer ces phénomènes.

Les mesures *in vitro* présentées dans le chapitre précédent ont montré que la valeur du potentiel bioélectrique engendré par le manteau est sous la dépendance de la tension partielle du CO_2 dans les solutions baignant les deux faces du tissu. Ce potentiel atteint une valeur maximum pour un gaz contenant de 4 à 5 % de CO_2 (fig. 23). La tension partielle moyenne du CO_2 pour des homogénats fraîchement préparés est de : $4,09 \% \pm 0,08$. Ces 2 valeurs sont du même ordre de grandeur. Les

réactions d'hydratation et de déshydratation de ce CO_2 sont continuellement catalysées par l'enzyme. Les résultats obtenus dans les expériences où l'enzyme est inhibé par le diamox montrent clairement que la seule action du pH est insuffisante pour modifier la concentration du calcium. En effet, pour les homogénats gazés avec le mélange O_2 - CO_2 5 % en présence de l'inhibiteur de l'enzyme, la valeur moyenne de la concentration du calcium ionique après une période de mise à l'équilibre de plusieurs heures est de $1,84 \text{ mM} \pm 0,26 \text{ mM}$. Les pH ne sont pas significativement différents pour les 2 groupes d'échantillons (voir tableau IV). Dans le premier cas, la concentration du calcium ionique est inférieure, pour un pH de 6,71, à celle qui peut être calculée à partir de la relation (10). Pour l'autre groupe d'échantillons, au contraire, le point déterminé par la valeur du pH et la $[Ca^{++}]$ se trouve dans l'intervalle de confiance de la droite de corrélation pH — $[Ca^{++}]$ définie par la relation (10).

L'équilibre dynamique entre la forme ionisée et la forme combinée du calcium est donc bien mis en évidence chez la moule d'eau douce. Ces échanges entre compartiments du calcium se font uniquement sous le contrôle de l'anhydrase carbonique.

L'enzyme joue un rôle plus important que la simple catalyse de l'hydratation du CO_2 . Ce rôle supplémentaire peut être soit celui d'un « protecteur » vis-à-vis du calcium fixé au sein d'une structure dans laquelle l'enzyme et le substrat sont intimement liés, soit celui de « vecteur », au cours du passage de la forme combinée vers la forme libre du métal.

Etant donné le caractère très particulier du rôle joué par l'anhydrase carbonique dans les mécanismes étudiés, il semble intéressant d'apporter quelques précisions sur cet enzyme.

TABLEAU IV

Valeurs d'équilibres pour le pH et la concentration du calcium ionique d'homogénats en fonction des conditions expérimentales des figures 26 et 27

(moyennes pour 6 expériences)

D'après M. Istín et J.-P. Girard, 1970b

	Homogénats	Homogénats + O_2 95 % - CO_2 5 %	Homogénats + Diamox + O_2 95 % - CO_2 5 %
pH $\pm$ E.S.	7,10 $\pm$ 0,04	6,66 $\pm$ 0,04	6,71 $\pm$ 0,04
Ca^{++} mM $\pm$ E.S.	2,97 $\pm$ 0,25	4,38 $\pm$ 0,28	1,84 $\pm$ 0,26

B) L'anhydrase carbonique dans le manteau.

1. - Principal caractère.

L'anhydrase carbonique est un enzyme très répandu dans le règne animal (Marren, 1967). Il intervient, nous l'avons vu, en catalysant la réaction d'hydratation du CO₂ et également en accélérant la réaction inverse de déshydratation des bicarbonates. Son rôle physiologique, très important chez l'homme, est multiple, ce qui explique les nombreuses études effectuées essentiellement sur les formes érythrocytaires. En effet cet enzyme est un mélange de plusieurs formes moléculaires qui sont de petites protéines solubles (P.M. = 30 000). Ces derniers caractères les différencient pleinement des anhydrases carboniques localisées dans le manteau de la moule comme nous allons le voir.

L'appareil de dosage de l'anhydrase carbonique est constitué par une chambre de réaction close, à volume constant. La solution à tester est placée dans le fond du récipient dans un tampon phosphate (pH = 6,8). Le substrat est constitué par une solution de bicarbonate dont le mélange avec la solution à tester ainsi que le brassage à l'intérieur de l'appareil se font par commande extérieure après une période de mise à l'équilibre de la température (0 °C) (Maetz, 1956). Le CO₂ formé, au pH de 6,8, par la dégradation du substrat, est libéré de la solution par l'agitation. La pression augmente à l'intérieur de la chambre de réaction. Les variations de pression sont suivies en fonction du temps

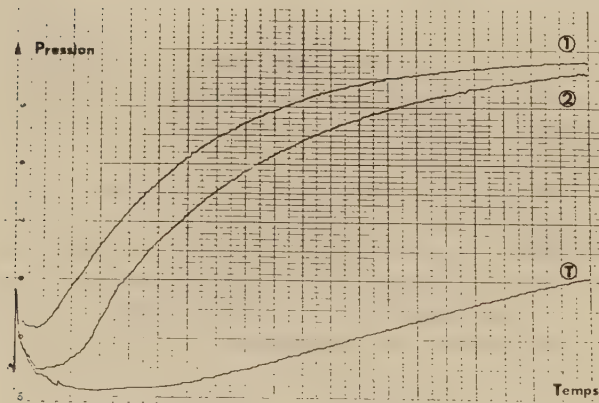


FIG. 29. — Mise en évidence d'une forme précipitable d'anhydrase carbonique dans un homogénat de manteau de moule. Photographie de l'enregistrement graphique des variations de pression en fonction du temps à l'intérieur de la chambre de réaction utilisée pour la mesure des activités enzymatiques. Les dilutions des échantillons sont les mêmes dans tous les cas. T = réaction non catalysée, (1) homogénat total, (2) culot de l'homogénat précédent après centrifugation. Noter que 85 % de l'activité initiale sont récupérés dans les culots (d'après Istin, M. et J.P. Girard, 1970c).

à l'aide d'une cellule manométrique reliée à un ensemble électronique TELCO (Modèle M 41 R). Un enregistreur graphique permet de les visualiser. Par un calcul simple (Maetz, 1956) l'activité enzymatique de l'échantillon testé peut être déterminée à partir de la vitesse de dégradation du substrat. La figure 29 est une illustration du type d'enregistrement obtenu au cours d'un dosage.

Une information intéressante sur la localisation de l'enzyme dans le tissu est apportée par l'expérience illustrée par la figure 29. Un homogénat est dosé pour son activité anhydrique (courbe 1). Une aliquote de cet homogénat est centrifugée cinq minutes à 2 000 x g. Le culot est resuspendu dans de l'eau distillée de manière à obtenir un volume final identique au volume initial. L'activité enzymatique de cette nouvelle suspension est dosée (courbe 2) dans les mêmes conditions de dilution que pour l'échantillon de départ (courbe 1). La comparaison entre ces deux courbes montre que le pourcentage de récupération de l'enzyme dans le culot est important. L'enzyme est donc lié à une structure précipitable à faible vitesse de centrifugation. Au moment de la préparation de l'homogénat, cette structure n'est pas désagrégée, ni l'enzyme libéré ; le séparer chimiquement de son support se révèle également très difficile. Des incubations à des températures et à des concentrations variables avec de nombreux agents chimiques ou biologiques (voir tableau V) n'ont pas donné de résultats significatifs. Aucune libération de l'enzyme dans la solution ne peut être mise en évidence.

TABEAU V

Produits testés	Concentrations utilisées
Pepsine (Fisher)	0,2 %
Hyaluronidase ovine (560 U.I/mg)	0,1 %
Chymotrypsine	0,05 %
Collagénase purifiée (Worthington Biochemical C°)	0,05 %
β Mercaptoéthanol	10 ⁻¹ M(0,05 %)
Dodecyl-sulfate	5,2 × 10 ⁻³ M à 1,7 × 10 ⁻² M
Acide acétique (20 %)	Gammes de pH 5,5 à 7,2

Liste des produits essayés sur des homogénats de manteau pour libérer l'anhydrase carbonique de la structure à laquelle elle se trouve fixée. Dans tous les cas, des incubations de durées variables ont été effectuées dans les 3 gammes de température de 6°, 20° et 37 °C. (D'après M. Istin et J.-P. Girard, 1970c.)

2. - Localisation de l'enzyme par rapport aux réserves du calcium.

Une importante fraction ($82,4 \pm 3,8$ - moyenne pour 7 expériences) de l'anhydrase carbonique est précipitable par une centrifugation modérée. Il en est de même ($89,1 \% \pm 1,7$ - moyenne pour 9 expériences) du calcium d'un homogénat. Ces deux résultats méritent d'être rapprochés parce qu'ils renforcent l'idée d'une localisation de l'enzyme proche des réserves du calcium. Cette observation a conduit à la préparation des deux expériences qui vont être présentées.

La première de ces expériences permet la visualisation des réserves du calcium. En effet, l'addition de dodécyl-sulfate à des homogénats de manière à obtenir une concentration finale de 5 %, permet, après incubation et centrifugation, d'obtenir des culots présentant un fort enrichissement en calcium ($37,4 \%$ du poids sec des culots pour *Margarita margaritifera*). Ces culots sont resuspendus et les suspensions placées sur des lames sont examinées au microscope optique. On peut observer de petits granules très denses sur les photographies de la figure 30. Il est ainsi permis de penser que ces granules représentent la forme de stockage du calcium à l'intérieur du manteau. Une confirmation radioautographique de cette hypothèse sera présentée au cours du dernier chapitre.

L'étude, plus précise, de la localisation de l'enzyme par rapport aux réserves de calcium du manteau est effectuée à l'aide d'expériences faisant appel à des sédimentations en gradient de force centrifuge (centrifugations isopycniques). Pour cela, des homogénats non traités par le dodécyl-sulfate sont préparés à partir de plusieurs manteaux et centrifugés. Les culots sont repris et resus-

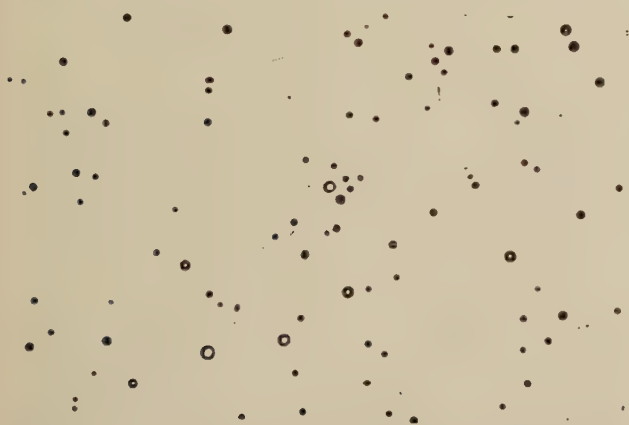


FIG. 30. — Microphotographie d'un culot resuspendu obtenu par la centrifugation d'un homogénat de manteau de moule traité par du dodécyl-sulfate (5 %). Les grains noirs représentent les réserves de calcium du manteau. Grossissement = 850 (d'après M. Istin et J.P. Girard, 1970c).

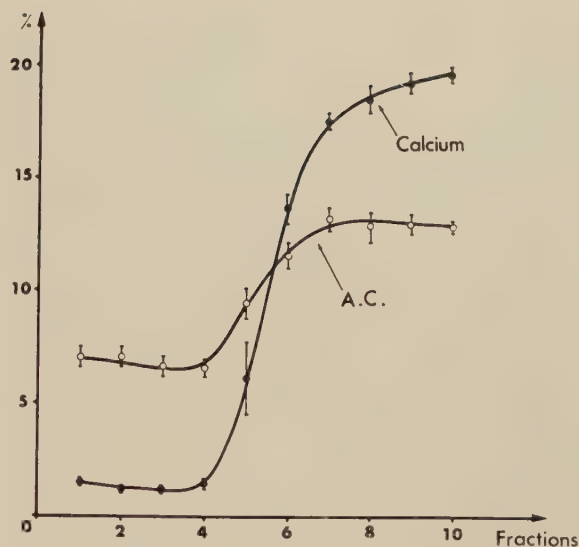


FIG. 31. — Répartition le long d'un gradient de force centrifuge du calcium et de l'anhydrase carbonique contenus dans un homogénat de manteau de moule d'eau douce. La force centrifuge est nulle en 0 et maximum pour la fraction 10. Chaque point représente des moyennes ($\pm$ E.S.) des valeurs trouvées au cours des 6 expériences. Les résultats sont exprimés en % de la quantité totale centrifugée (d'après M. Istin et J.-P. Girard, 1970c).

pendus avec une solution de sucrose ($d = 1,15$) de manière à avoir un volume final sensiblement égal au volume initial de l'homogénat. Cette nouvelle suspension est à nouveau centrifugée. La vitesse de rotation de la centrifugeuse est augmentée progressivement en l'espace de 2 heures pour finir par une phase de 10 minutes pendant laquelle la force centrifuge est de $2000 \times g$ dans le fond des pots. Après décélération, le contenu des pots est collecté en fractions égales de 1 ml. La fraction (1) est la plus proche de l'axe de la centrifugeuse, la fraction (10) la plus éloignée. La quantité de calcium total, après minéralisation, et l'activité anhydrique sont dosées dans chacune des fractions.

Ces centrifugations isopycniques permettent d'établir les courbes de répartition du calcium et de l'anhydrase carbonique le long du gradient de force centrifuge. La figure 31 illustre les résultats obtenus. Chaque point correspond à la moyenne des valeurs mesurées pour 6 expériences de même type. L'allure générale de ces 2 courbes laisse prévoir une relation entre les 2 paramètres mesurés. C'est cette relation qui va être étudiée.

Si l'enzyme se trouve intimement associé aux granules qui constituent les réserves de calcium, et qui sont assimilés à des sphères, cette association ne peut s'effectuer que de deux manières. L'enzyme peut être uniformément réparti dans leur masse et sa quantité sera alors proportionnelle aux volumes des sphères, ou bien l'enzyme est localisé seulement à la surface et sa quantité sera

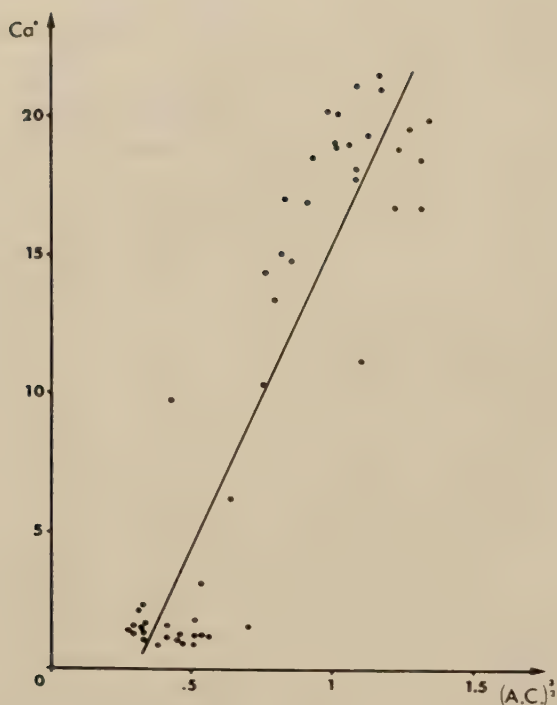


FIG. 32. — Relation entre les quantités de calcium total et celles d'anhydrase carbonique dans des homogénats de manteau. L'équation de la droite est donnée dans le texte. Cette corrélation montre que l'anhydrase carbonique est localisée à la surface des sphères contenant les réserves de calcium du manteau (d'après M. Istin et J.-P. Girard, 1970c).

dans les différentes fractions, proportionnelle à la surface des granules. L'étude des courbes de la figure 31, montre que cette deuxième hypothèse est la seule qui doit être retenue. En effet, s'il y a une répartition uniforme de l'enzyme à la surface des granules, la quantité totale d'enzyme (A.C.) présent dans chaque fraction sera proportionnelle au carré du rayon moyen des granules de cette fraction, soit :

$$(A.C.) = K r^2 \quad (11)$$

Pour une même fraction, le calcium (Ca^0) sera réparti dans la masse des granules et dépendra donc de leur volume.

$$(Ca^0) = K' r^3 \quad (12)$$

La combinaison des relations (11) et (12) permet d'écrire la relation (13) :

$$(Ca^0) = K'' A.C.^{3/2} \quad (13)$$

L'existence d'une relation linéaire pour les différentes fractions entre (Ca^0) d'une part et ($A.C.^{3/2}$) d'autre part se trouve vérifiée. La droite de régression présentée sur la figure 32 en est l'illustration.

Son équation est :

$$(Ca^0) = 21,16 (A.C.^{3/2}) - 5,86$$

Pour les mêmes données expérimentales, la valeur du coefficient de corrélation est de $r = 0,92$ (pour 50 valeurs).

La condition nécessaire découlant de l'hypothèse avancée sur la localisation de l'enzyme à la surface des granules calcifiés se trouve ainsi remplie. Si la démonstration qui vient d'être présentée n'est pas suffisante pour affirmer avec certitude que l'enzyme est localisé sur cette surface, l'hypothèse sur la répartition homogène de l'enzyme à l'intérieur de la masse du granule peut, au moins, être éliminée avec certitude.

L'étude de la nature de la liaison chimique de l'enzyme à son support, de même que les caractéristiques de ce support, ne pourront être abordées que lorsqu'une technique de séparation des deux éléments constitutifs n'entraînera pas la dénaturation ou l'inhibition de l'anhydrase carbonique. Un travail biochimique a toutefois été entrepris sur la fraction soluble de l'enzyme présente dans les homogénats. Il a en effet paru intéressant de déterminer, si comme pour les vertébrés supérieurs, plusieurs formes moléculaires ayant une activité anhydrique pouvaient être décelées.

3. - Séparation et identification des anhydrases carboniques « solubles ».

La séparation est effectuée par chromatographie de solutions préparées à partir d'homogénats de manteau et de branchie. Une colonne remplie de DEAE Sephadex A - 50, qui est un échangeur anionique, est utilisée en suivant la technique mise au point pour la séparation des anhydrases carboniques érythrocytaires humaines (Armstrong et col., 1966). L'élution des protéines fixées sur la colonne permet de mettre en évidence trois pics d'activité enzymatique (fig. 33). Les principaux caractères

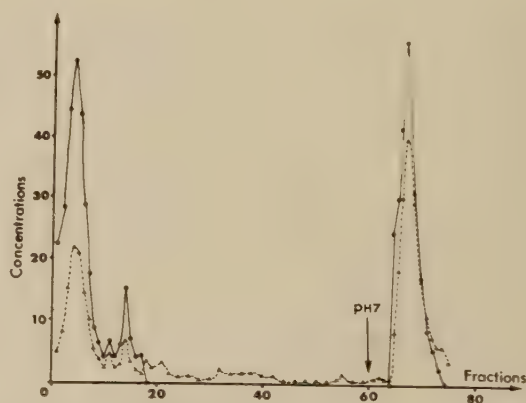


FIG. 33. — Elution chromatographique des différentes formes moléculaires d'anhydrase carbonique du manteau et des branchies des moules à partir d'une colonne DEAE Sephadex A - 50. L'activité enzymatique (●) est exprimée en unités arbitraires, la quantité de protéines en milligrammes (▲) (d'après M. Istin et J.-P. Girard, 1970a).

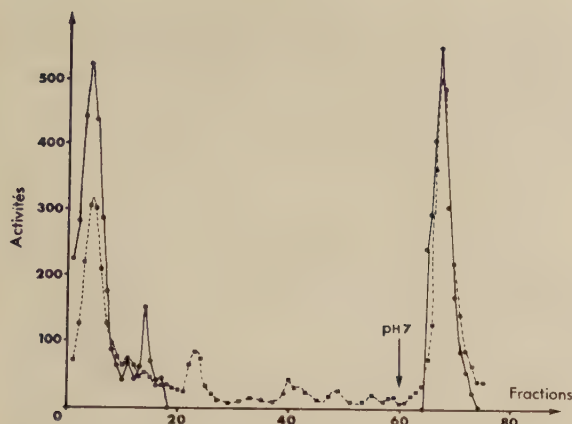


FIG. 34. — Chromatographie montrant la présence de zinc dans les molécules d'anhydrase carbonique de lamellibranches. Des animaux ayant séjourné dans des aquariums dont l'eau contient du ^{65}Zn sont utilisés pour les préparations. Le processus expérimental est voisin de celui utilisé pour l'expérience illustrée par la figure 33. (●) activité enzymatique, (▲) ipm. en ^{65}Zn (d'après M. Istin et J.-P. Girard, 1970a).

de ces formes moléculaires sont rapportés sur le Tableau VI. Il est également intéressant de noter que les molécules de ces formes enzymatiques contiennent du zinc (fig. 34) comme celles des mammifères, qui sont des animaux ayant atteint un stade d'évolution beaucoup plus avancé. Les comparaisons avec les formes enzymatiques érythrocytaires méritent d'être poussées plus loin.

4. - Analogies avec les anhydrases carboniques érythrocytaires.

Suivant la nomenclature adoptée pour les formes érythrocytaires et par analogie, l'ordre de sortie de la colonne DEAE Sephadex A-50 est pour ce type d'élution : C, B et A. De même que pour les hématies des mammifères, trois formes moléculaires ayant une activité enzymatique peuvent être

TABLEAU VI

Séparation

de différentes formes d'anhydrase carbonique par chromatographie sur un échangeur anionique (Sephadex A-50) :

importance et activité spécifique relative

D'après M. Istin et J.-P. Girard, 1969

Ordre d'élution	1 : (C)	3 : (A)	2 : (B)
Ph d'élution	8,7	7	8,7
Importance relative (%)	41,35 ± 14,1	42,81 ± 8,5	15,09 ± 5,30
Activité spécifique relative	3,5	1	3,5

isolées des tissus de moule d'eau douce. Alors que chez l'homme la forme B est la plus abondante, la forme A la moins abondante, ce rapport est inversé dans les tissus étudiés. Les activités spécifiques relatives sont également différentes de celles des formes érythrocytaires. En effet, si pour chaque expérience l'activité enzymatique spécifique (Unités/mg de protéines) de la forme A est choisie comme étant égale à 1, les activités enzymatiques spécifiques de B et C sont 3,5 fois plus élevées (Tableau VI). Chez l'homme, la forme B, la plus abondante (80 %), a une activité spécifique relative identique à celle de la forme A qui n'intervient que pour 4 % de l'activité totale. Il semble donc bien que la forme A éluée à pH 7 représente une espèce moléculaire réellement présente dans les tissus de l'animal et non un artéfact apparaissant au cours de la séparation comme cela a été longtemps suggéré pour la forme érythrocytaire. Cette hypothèse semble confirmée par l'étude de la structure tridimensionnelle effectuée par Reynaud et col. (1969) sur la forme A érythrocytaire humaine. Pour ces auteurs, cette molécule est ellipsoïdale alors que les enzymes B et C, sont globulaires. Si une analogie peut être faite entre les préparations d'enzyme érythrocytaires humaines et tissulaires de moule c'est, selon nous, la forme A qui a le plus de chances d'être liée à un support protéique dont la nature nous est, rappelons-le, encore inconnue.

III. — RAPPORTS ENTRE STRUCTURE ET FONCTION : LOCALISATION HISTOLOGIQUE DES COMPARTIMENTS DU CALCIUM

Le chapitre précédent mettait en évidence, dans des homogénats de manteau, le mécanisme régulateur de l'équilibre entre les concentrations du calcium ionisé et celles des carbonates et bicarbonates. Les observations rapportées suggèrent que l'anhydrase qui contrôle ce mécanisme est liée aux réserves de calcium qui sont constituées par des micropores. Le but de ce chapitre est de reprendre, par des techniques histologiques, l'étude des structures de la partie centrale du manteau. Pour cela, un rappel sommaire des éléments les plus caractéristiques de ces structures sera suivi par la présentation d'expériences sur la localisation des deux compartiments du calcium par radioautographie. Ces résultats permettront alors de considérer le manteau sous son aspect d'organe fonctionnel et d'en discuter le rôle.

A) Structure générale du manteau.

L'étude la plus récente sur la structure du manteau d'un bivalve a été publiée par Kawaguti et

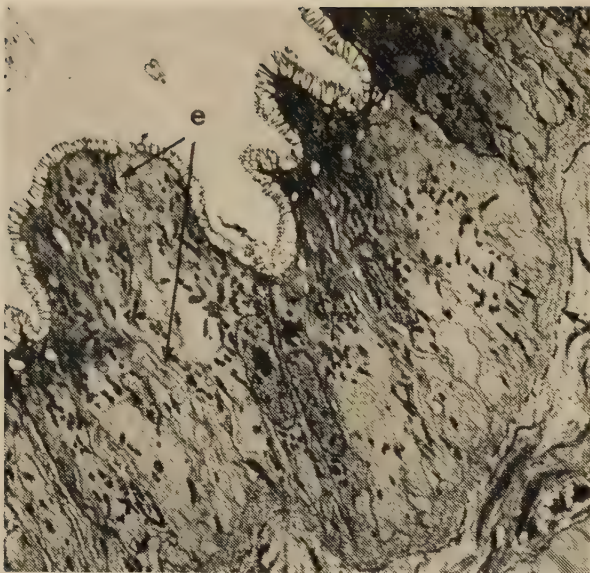


FIG. 35. — Photographie au microscope électronique de l'épithélium, côté coquille de la partie centrale d'un manteau de moule (*Anodonta grandis*). Noter les espaces intercellulaires (e), la membrane basale des cellules épithéliales entre les flèches, les mitochondries plus nombreuses à la partie apicale des cellules, la bordure en brosse. Grossissement = 2 500.

Ikemoto (1962). Bien que notre travail soit effectué avec des espèces différentes, les mêmes caractères généraux avancés par ces auteurs se retrouvent sur notre matériel.

Pour l'examen au microscope électronique, des fragments de manteau excisés du reste du corps de l'animal sont préparés comme suit. Deux modes de fixation ont été utilisés :

- fixation au tétroxyde d'osmium à 2 % et inclusion dans du méthacrylate ;
- ou double fixation par la glutaraldéhyde à 1 % dans un tampon bicarbonate (Tableau I). Cette fixation est suivie d'une post-fixation au tétroxyde d'osmium à 2 %. L'inclusion se fait alors dans de l'épon. Les coupes sont contrastées par l'acétate d'uranyle en solution alcoolique puis par le citrate de plomb.

La vue générale de la figure 3 met en évidence les trois parties essentielles qui composent le tissu : l'épithélium limitant la cavité, la partie interstitielle, l'épithélium situé contre la coquille.

1. - Les épithéliums :

Nous insisterons surtout sur les caractères qui sont en rapport avec les mécanismes de la calcification.

* On définit par pinocytose le mécanisme qui permet à la cellule l'absorption de fluides et de macromolécules extracellulaires par un processus voisin de la phagocytose.

La figure 35 représente la couche épithéliale côté coquille. On note la présence d'une bordure en brosse sur la face apicale des cellules. Les microvillosités, en augmentant de façon considérable la surface d'un épithélium, représentent un facteur favorable aux échanges.

L'abondance des mitochondries à la partie apicale de ces mêmes cellules est l'indice de la grande activité métabolique dont elles sont le siège. Cette activité n'est pas liée aux mouvements du calcium qui, comme nous l'avons vu, sont passifs. Leur rôle pourrait donc être lié à un autre métabolisme : la synthèse des constituants de la trame protéique de la coquille, par exemple, sujet dont il sera discuté plus loin.

La très épaisse membrane basale de ces cellules épithéliales doit aussi être notée. Elle retiendra particulièrement notre attention comme on le verra par la suite, car elle semble jouer un rôle particulier dans les mouvements du calcium.

La structure de l'épithélium limitant la cavité (fig. 36) est très différente. Nos observations concordant avec celles déjà publiées dans la littérature, nous nous bornerons à rappeler que c'est un épithélium cilié, également bordé par des microvillosités. D'abondantes cellules à mucus ou de sécrétion peuvent y être observées. Les nombreuses vacuoles de la partie apicale des cellules sont probablement impliquées dans les mécanismes de la pinocytose* mis en évidence par Nakahara et Bevelander (1967) pour différentes espèces de lamelli-branches.

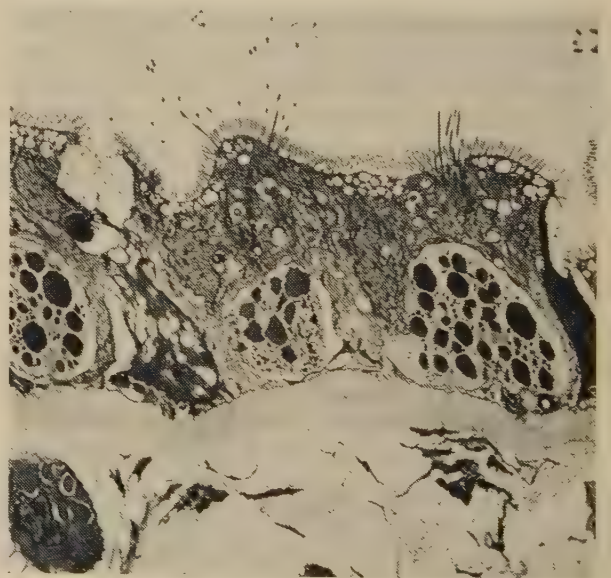


FIG. 36. — Epithélium, côté cavité, de la partie centrale d'un manteau d'anodonte. Remarquer : la bordure en brosse, les vacuoles de pinocytose, la trame fibreuse à la base des cellules. Grossissement = 2 500.

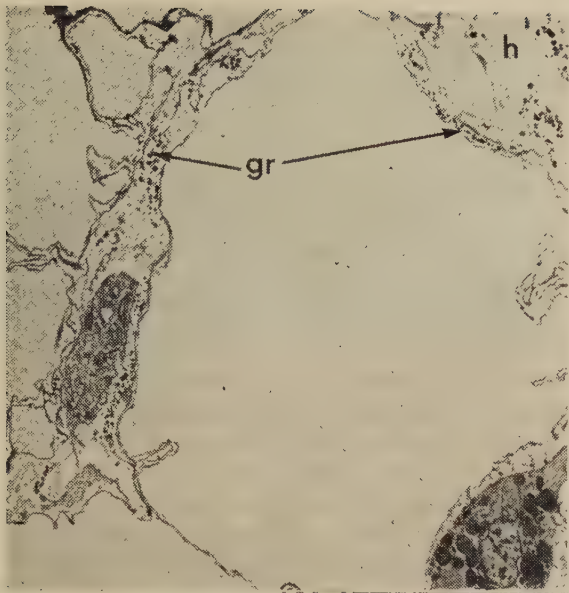


FIG. 37. — Partie interstitielle de la partie centrale d'un manteau de moule. Noter la localisation extracellulaire des microperles (gr) dans les espaces hémolymphatiques (h).
Grossissement = 2 500 (d'après M. Istin et col., 1970).

2. - La partie interstitielle.

Souvent négligée dans les études sur la calcification, la partie interstitielle du manteau semble pourtant jouer un rôle très important. Toutefois, de grandes difficultés se sont présentées pour la préparation des coupes fines de la partie centrale du manteau, montrant ainsi l'hétérogénéité du tissu. Les arrachements fréquents nécessitent, en fonction du but recherché, l'emploi de l'un ou l'autre des modes d'inclusions rapportés précédemment. Ainsi, après inclusion dans du méthacrylate, des coupes d'une épaisseur de 900 à 1 500 Å° peuvent être préparées. Une de ces coupes est photographiée au microscope électronique (fig. 37). De nombreuses cellules musculaires, conjonctives ou de réserves, entourées d'espaces hémolymphatiques par lesquels diffuse le sang de l'animal, ont été décrits dans ce tissu. Plus intéressante est la localisation extracellulaire de granules denses aux électrons. Ces granules sont, suivant les espèces, en quantités et tailles variables. Abondants et gros ($1,2 \mu$ max.) chez *Margarita margaritifera*, ils sont plus petits ($0,4 \mu$ max.) et moins nombreux chez *Anodonta grandis* (fig. 37). Mais, dans toutes les espèces, ils sont très souvent emprisonnés au milieu d'un dense réseau de fibres de collagène et à proximité de cellules musculaires (fig. 38). Ces granules sont les mêmes que ceux isolés par centrifugation à partir d'homogénats de manteau (fig. 30). Des informations sur leur structure sont obtenues après double fixation et inclusion dans une résine époxy. Malheureusement, au cours de la préparation des coupes, un arrachage important se produit. Seuls quelques granules sont bien conservés au milieu de nombreuses empreintes

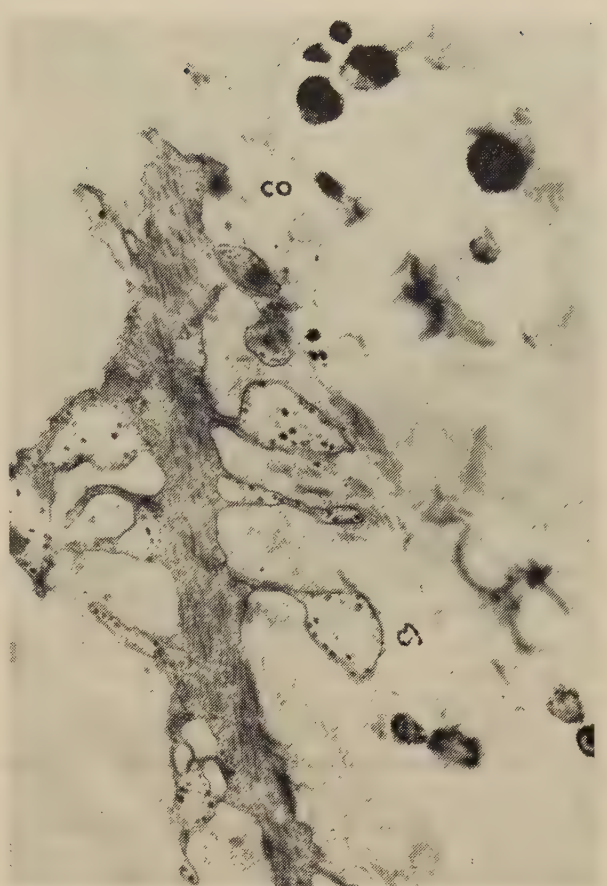


FIG. 38. — Cellule musculaire du tissu interstitiel de la partie centrale d'un manteau d'*Anodonta*. Les fibres de collagène (co) entourent la cellule musculaire et lui servent de support quand elle se contracte. Ces fibres immobilisent également les granules calcifiés dans les espaces extracellulaires. Grossissement = 12 600.

(fig. 39). Un fort grossissement fait apparaître leur structure concentrique multilamellaire (fig. 40). L'identification de ces granules à la forme de réserve du calcium est apportée par l'étude radioautographique qui suit.

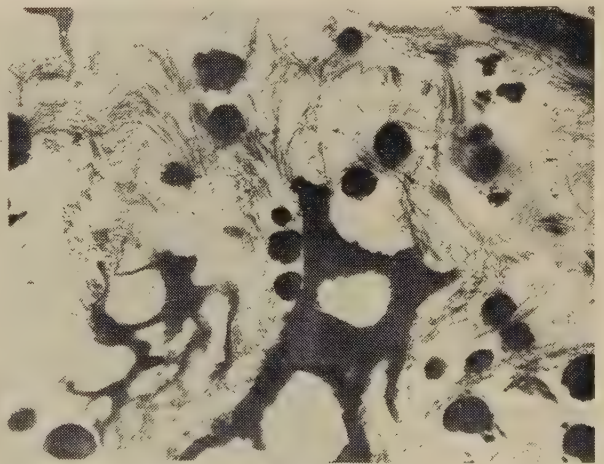


FIG. 39. — Zone avec de nombreux granules calcifiés extracellulaires dans le tissu interstitiel du manteau d'une *Anodonta*. Remarquer les nombreuses fibres de collagène qui entourent les granules. Inclusion Epon, Grossissement = 11 500 (d'après M. Istin et J.-P. Girard, 1970c).



FIG. 40. — Granules calcifiés. La structure multilamellaire apparaît très clairement. Grossissement = 66 700.

B) Localisation des compartiments du calcium.

1. - Le compartiment rapidement renouvelable.

Le marquage du calcium du compartiment ionique rapidement échangeable se fait *in vitro* par immersion du manteau dans une solution d'hémolymphe artificielle dont le calcium est marqué au ^{45}Ca (R.A.S. : 15 à 40 mCi/mg). La durée du marquage est d'une heure, ce qui correspond environ à une période biologique (Tableau II). Les fragments de tissu sont ensuite déshydratés par cryosubstitution dans l'acétone à -25°C , puis fixés pendant une heure à zéro degré par une solution

osmique à 2 % dans un tampon bicarbonate. Les radioautographies sont préparées sur des coupes semi-fines avec l'émulsion ILFORD K5. La durée de l'exposition est de 8 jours à un mois.

Les photographies de la figure 41 permettent la localisation du compartiment du calcium ionique. Une bonne visualisation des traces radioautographiques apparaît sur les prises de vue sur fond noir et en lumière blanche. Il est intéressant de noter l'intensité du marquage au niveau des deux épithéliums. L'absence de grains d'argent dans le cytoplasme des cellules interstitielles ainsi que dans les espaces extracellulaires de ce tissu est également à retenir. En effet, l'on pourrait s'attendre à trouver le radio-calcium en quantité abondante dans les régions extracellulaires du tissu interstitiel. Son absence est probablement due à un artéfact lié à la préparation (Istin et col., 1970).

2. - Le compartiment lentement renouvelable.

Pour marquer le compartiment du calcium lentement échangeable, des animaux sont conservés 15 jours à 15°C dans des aquariums dont l'eau contient 2 millicuries (radioactivité spécifique 15 à 40 mCi/mg) de calcium 45 par litre. Avant fixation, les manteaux sont rincés pendant 1 h 30 environ dans une solution aérée non radioactive (Tableau I), plusieurs fois renouvelée. La durée du rinçage est choisie en fonction de la valeur de la période biologique du calcium rapidement échangeable (Tableau II). La plus grande partie du radiocalcium non fixé est ainsi éliminée. Après inclusion et préparation des coupes, la technique radioautographique utilisée est celle décrite par

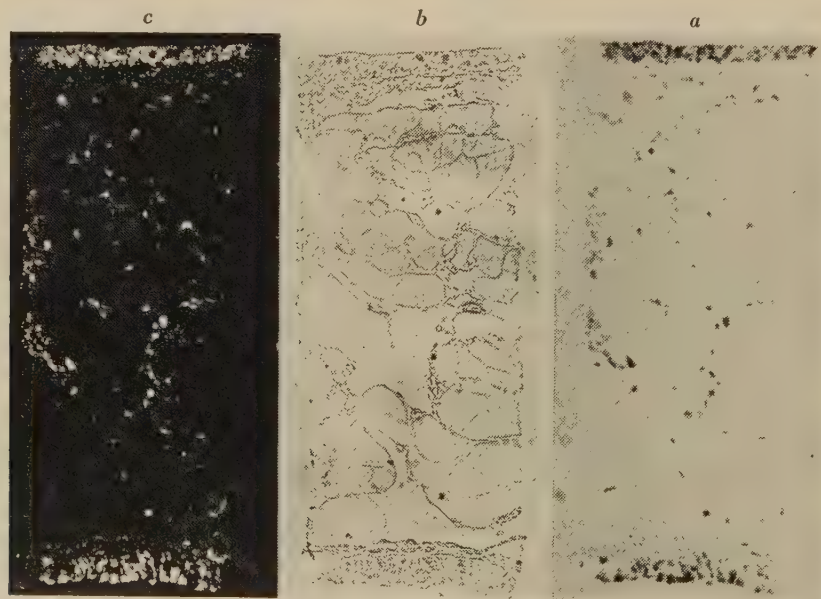


FIG. 41. — Localisation du compartiment rapidement renouvelable du manteau d'*Anodonta*, par autoradiographie. Photographie en lumière blanche en (a), en contraste de phase (b) et fond noir (c). En bas l'épithélium situé contre la coquille. Exposition 8 jours, grossissement $\times 270$, marquage avec ^{45}Ca pendant 45 minutes.

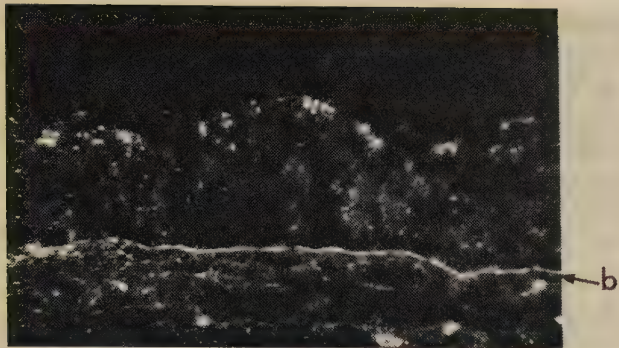


FIG. 42. — Autoradiographie (^{45}Ca) de l'épithélium côté coquille et de sa partie sous-jacente permettant la localisation du calcium lentement échangeable. Photographie en fond noir. Observer l'intensité du marquage de la membrane basale. Exposition : quinze jours. Grossissement $\times 350$ (d'après M. Istin et col., 1970).

Droz (1967). L'émulsion Ilford L4 est utilisée pour les coupes fines. Le temps d'exposition est de l'ordre de 3 mois pour ces préparations à haute résolution.

Deux résultats intéressants se dégagent des autoradiographies préparées de cette manière. Le premier est illustré par la figure 42, qui représente une autoradiographie de l'épithélium et de sa partie sous-jacente. Cette photo laisse très clairement apparaître un nombre important de grains d'argent superposés à la membrane basale. Ceci montre qu'une forte quantité de calcium est fixée à ce niveau. L'animal ayant servi à la préparation de cette radioautographie avait séjourné plus de 15 jours dans de l'eau dont le calcium était marqué au ^{45}Ca . Il est impossible d'obtenir une image similaire avec un témoin non marqué. Ce résultat doit être rapproché du profil de potentiel électrique du manteau déjà présenté au chapitre précédent (fig. 21).

Plus intéressant nous semble être le deuxième résultat car il permet d'identifier les réserves du calcium aux granules (fig. 43). La superposition des traces d'argent sur ces granules apparaît très clairement sur l'image radioautographique.

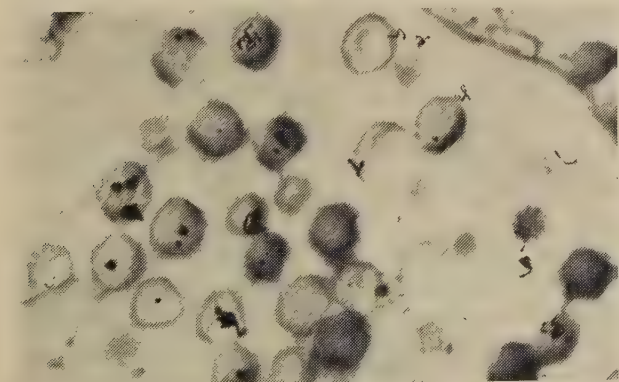


FIG. 43. — Localisation du compartiment du calcium lentement échangeable par autoradiographie à haute résolution. Les traces dues au ^{45}Ca sont localisées par les granules. Exposition 3 mois. Grossissement $\times 9\,600$ (d'après M. Istin et col., 1970).

C) Sur la localisation histologique de l'enzyme.

Au cours du chapitre précédent nous avons montré que l'anhydrase carbonique semblait localisée à la surface des granules calcifiés et que ses formes moléculaires solubles renfermaient un atome de zinc. En utilisant cette dernière propriété, il était intéressant de vérifier la localisation histologique de l'enzyme par radioautographie avec des morceaux de tissu d'animaux ayant séjourné dans des aquariums dont l'eau contenait du ^{65}Zn . Malheureusement, les caractéristiques physiques du ^{65}Zn , et les difficultés rencontrées pour marquer des animaux avec une radioactivité spécifique suffisamment élevée, n'ont pas permis la préparation de radioautographies à haute résolution. Seules celles en microscopie photonique ont donné de bons résultats. La photographie de la figure 44 montre que le ^{65}Zn se fixe dans des régions où sont généralement localisées les réserves du calcium. C'est la mauvaise définition due aux limites de la technique qui ne permet pas une localisation plus précise. Un marquage abondant du noyau des cellules épithéliales à l'exclusion du nucléole apparaît également sur ces photos ; il n'est pas dû à l'anhydrase carbonique mais vraisemblablement à d'autres enzymes contenant également du zinc dans leurs molécules.

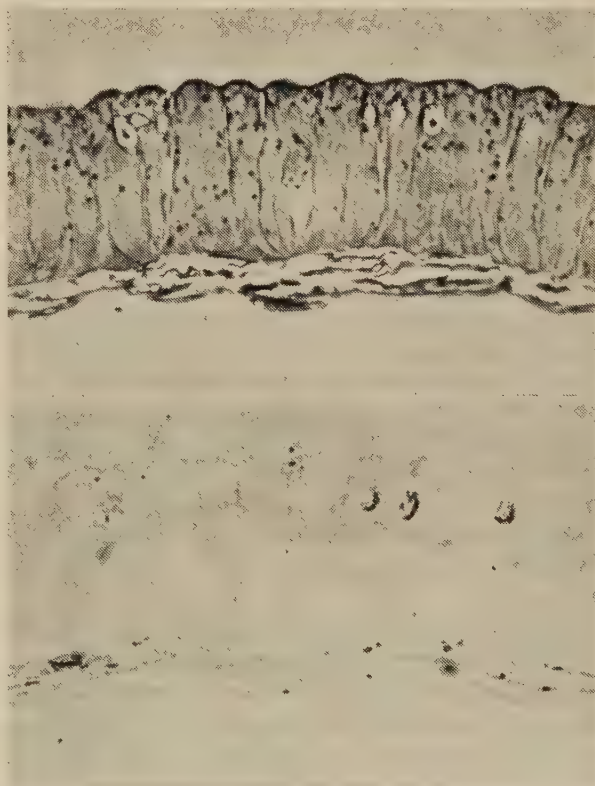


FIG. 44. — Autoradiographie d'une coupe histologique d'un manteau d'Anodonte ayant séjourné 15 jours dans un aquarium dont l'eau contenait du ^{65}Zn . A l'exclusion des noyaux, les grains d'argent sont localisés sous la membrane basale de l'épithélium côté coquille où se trouvent généralement de nombreux granules calcifiés. En haut, photographie en lumière polarisée, en bas sur fond blanc. Exposition 5 semaines. Inclusion méthacrylate. Grossissement = 315.

IV. — DISCUSSION

Au terme de cette étude, il est possible d'en résumer comme suit les résultats.

La moule d'eau douce prélève dans le milieu ambiant le calcium qui lui est nécessaire pour former sa coquille. Le manteau joue un rôle majeur dans cette opération. On pouvait penser que ce tissu était le siège d'un transport actif de calcium du milieu ambiant vers la cavité extrapalléale. Nos observations n'ont pas confirmé cette hypothèse.

Les éléments nécessaires à la calcification sont amenés vers le manteau, puis, à travers celui-ci, vers les sites d'élaboration de la coquille. Un apport direct de calcium à travers l'épithélium limitant la cavité palléale reste possible bien qu'un apport alimentaire demeure plus vraisemblable.

La perméabilité des membranes des cellules de l'épithélium côté coquille est sélective pour le calcium. Elle suit avec une grande rigueur les lois de la diffusion. Ceci est intéressant d'un double point de vue :

— L'anion associé au calcium n'agit pas en tant que molécule chargée dans les phénomènes de diffusion. Il faut s'attendre à le voir traverser les membranes sous forme de CO_2 dissous et non sous forme d'ion carbonate ou bicarbonate. L'observation de la vitesse de changement de la d.d.p., « calcium dépendante », quand la tension partielle du CO_2 est modifiée dans les solutions baignant les faces externes des épithéliums, confirme cette manière de voir.

— La grande perméabilité passive de la membrane permet de maintenir la concentration ionique du calcium dans le liquide extrapalléal comme dans l'hémolymphe à la valeur de saturation. Cette dernière est liée aux variations du pH et de la tension partielle du CO_2 dans les liquides extracellulaires du manteau. Elle crée la condition idéale permettant une cristallisation naturelle du carbonate de calcium, et ainsi une dépense minima d'énergie.

Les expériences d'électrophysiologie et les études radioautographiques montrent que la membrane basale des cellules épithéliales côté coquille, jouent un rôle différent de celui de la membrane apicale. Ce rôle particulier, lié au métabolisme du calcium, ne nous apparaît pas encore très clairement et mérite une étude ultérieure plus approfondie.

Le CO_2 dissous qui diffuse à travers les membranes est d'origine métabolique (Jodrey et Wilbur, 1955 ; Wilbur et Jodrey, 1955 ; Wilbur, 1964). Il

existe donc toujours en quantité suffisante. En effet, la tension partielle du CO_2 dans les liquides de l'animal est constante (4,5 % à 5 %). Elle correspond à un équilibre entre le CO_2 d'origine métabolique et celui qui est éliminé, soit par diffusion au cours de processus respiratoires, soit sous une forme précipitée. Ceci nous conduit à parler des mécanismes régulateurs des concentrations du calcium et du CO_2 .

D'abondantes réserves de calcium ont été mises en évidence dans le tissu interstitiel sous la forme de granules calcifiés extracellulaires. Elles sont donc en contact permanent avec l'hémolymphe qui circule dans ce tissu, ce qui permet un passage rapide, dans un sens ou dans l'autre, de la forme liée à la forme libre du calcium. Or de tels échanges se font en présence de CO_2 et sous le contrôle de l'anhydrase carbonique. Cet enzyme se trouve dans ce cas particulier exceptionnel non pas sous forme dissoute, mais associé morphologiquement aux réserves de calcium. De plus, c'est la première fois qu'il peut lui être attribué un rôle plus important que la simple catalyse des réactions d'hydratation ou de déshydratation du CO_2 . Cet ensemble homogène, que constituent l'enzyme et son substrat, est un système autonome, facile à isoler et permettant des études *in vitro* sur le mécanisme de la calcification ou de la décalcification.

On retrouve en effet, dans le tissu interstitiel tous les éléments nécessaires à une calcification. Ces éléments sont :

- le collagène sous une forme polymérisée, visible au microscope électronique ;
- une trame protéique bien définie, orientant le dépôt des cristaux de carbonate de calcium ;
- l'enzyme qui contrôle le passage du calcium sous l'une ou l'autre de ses formes libre ou combinée. Ces différents éléments maintiennent, rappelons-le, automatiquement dans l'hémolymphe un équilibre entre le pH, la tension partielle du CO_2 , et la concentration du calcium ionique. Cette dernière est le facteur limitant et doit se maintenir à sa valeur maximum. Ce mécanisme assure de manière remarquable le tamponnement immédiat des liquides extracellulaires.

Il est possible qu'un tel système se retrouve chez les vertébrés. D'une part Lörcher et Neweselyh (1969) suggèrent que la calcite de la partie médullaire des os de la poule représente le calcium mobilisable pendant la période de ponte. Les carbonates de calcium (calcite) entrent en effet pour 15 à 30 % dans la composition des os des vertébrés, le reste étant du phosphate de calcium (hydroxyapatite). Siegmund et Dulce (1960) ont montré que

le traitement par le diamox entraînait une baisse du calcium plasmatique chez de jeunes poulets. Ces auteurs pensent que la déminéralisation de l'os provoquée par une sécrétion d'ions hydrogène par les ostéoclastes serait dans ce cas inhibée. Il faut ajouter que les cellules osseuses des oiseaux et des poissons contiennent de l'anhydrase carbonique (Dulce et col., 1960).

D'autre part il a été montré tout récemment sur des rats (Stahl et Kenny, 1969) que la mobilisation aussi bien que le dépôt du calcium qui sont sous la dépendance d'hormones comme la calcitonine, sont susceptibles d'être inhibés par le diamox. Cette dernière observation suggère également l'intervention de l'anhydrase carbonique. Ces différents travaux démontrent l'intérêt de l'étude de mécanismes régulateurs de la calcémie qui sont probablement voisins dans le manteau de la moule.

Peut-être aussi riche de promesses pour un travail futur est la localisation extracellulaire des granules calcifiés dans le manteau. En effet, il serait très intéressant de déterminer quels sont les facteurs qui induisent et permettent ces formations et synthèses extracellulaires. Cette question pose également le problème de la formation de la trame protéique et de son association à la partie miné-

rale des granules. Une situation identique se retrouve dans l'élaboration de la coquille. On assiste à la synthèse et à la calcification d'une trame protéique par des cellules qui se trouvent séparées des zones de dépôt par le liquide extrapalléal. Bevelander et Nakahara (1969) ont publié les résultats d'un travail effectué au microscope électronique sur la formation de la couche nacrée de la coquille de certains bivalves. Ils ont fixé et préparé des sections de tissus de consistances aussi différentes que le manteau, le liquide extrapalléal, et la partie de coquille sous-jacente de *Mytilus exustus* ou *Anomia simplex*. Ces auteurs s'interrogent sur l'origine de la trame protéique et suggèrent qu'elle apparaît par polymérisation d'une partie du liquide extrapalléal, donnant ainsi naissance à une lamelle protéique parallèle à la surface apicale des cellules épithéliales. Cette lamelle migre et va se déposer sur la coquille. Il est généralement admis que les constituants de la matrice organique sont élaborés par l'épithélium du manteau avant minéralisation (Wilbur, 1964). Cette hypothèse semble confirmée par la grande activité métabolique dont les cellules de cet épithélium sont le siège comme le montre la présence de très nombreuses mitochondries à leur partie apicale. Le rôle des microvillosités qui bordent cet épithélium paraît également jouer un rôle important dans l'élaboration de la trame protéique mais il reste mal établi.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J. ARMSTRONG, D.V. McD. MYERS, J.A. VERPOORTE et J.T. EDSALL (1966). — Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* **214**, 5137-5149.
- [2] G.E. BEEDHAM (1968). — Observations on the mantle of the lamellibranchia. *Quart. J. Micro. Sci.* **99**, 181-197.
- [3] G. BEVELANDER et J. MARTIN (1949). — Culture of mantle tissue of marine molluscs. *Anat. Record.*, **105**, 614 (Abstract).
- [4] G. BEVELANDER et H. NAKAHARA (1969). — An electron microscope study of the formation of the nacreous layer in the shell of certain bivalve molluscs. *Calc. Tiss. Res.* **3**, 84-92.
- [5] B. DROZ (1967). — Synthèse et transfert des protéines cellulaires dans les neurones ganglionnaires. Etude autoradiographique quantitative en microscopie électronique. *J. Microscopie*, **6**, 201-228.
- [6] H.J. DULCE, P. SIEGMUND, F. KÖRBER et E. SCHÜTTE (1960). — Über das Vorkommen von Carboanhydratase im Knochen. *Hoppe Zeyler Z. Physiol. Chem.* **320**, 163-167.
- [7] M. FLORKIN et P. DE MARCHIN (1941). — Distribution de l'anhydrase dans les tissus de l'Anodonte. *Arch. intern. physiol.* **51**, 130-132.
- [8] A. HIRATA (1953). — Studies on shell formation. II. A mantle shell preparation for *in vitro* studies. *Biol. Bull.* **104**, 394-397.
- [9] M. ISTIN (1964). — Perméabilité au calcium du manteau de divers lamellibranches étudiée à l'aide d'isotopes radioactifs. Thèse de Doctorat de Spécialité. *Faculté des Sciences*, Paris.
- [10] M. ISTIN et J. MAETZ (1964). — Perméabilité au calcium du manteau de lamellibranches d'eau douce étudiée à l'aide des isotopes ^{45}Ca et ^{47}Ca . *Biochim. Biophys. Acta.* **88**, 225-227.
- [11] M. ISTIN (1968). — Indicateurs nucléaires et mouvements des ions dans les systèmes biologiques. *Industries Atomiques*, 5/6, 50-56 et 7/8, 60-65.
- [12] M. ISTIN et L.B. KIRSCHNER (1968). — On the origin of the bioelectrical potential generated by the freshwater clam mantle. *J. Gen. Physiol.* **51**, 478-496.
- [13] M. ISTIN et J.-P. GIRARD (1969a). — Séparation d'anhydres carboniques à partir de tissus d'un invertébré. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, 1363-1366.
- [14] M. ISTIN et J.-P. GIRARD (1970a). — Dynamic state of calcium reserves in freshwater clam mantle. *Calc. Tiss. Res.* (sous presse).
- [15] M. ISTIN et J.-P. GIRARD (1970b). — Carbonic anhydrase and mobilisation of calcium reserves in the mantle of lamellibranchs. *Calc. Tiss. Res.* (sous presse).
- [16] M. ISTIN, A. MASONI et B. FOSSAT (1970). — Rapports entre structure et fonction du manteau des moules pour la formation de la coquille (en préparation).

- [17] K. JANACEK (1962). — Observations on the mantle of the lamellibranchia. *Quart. J. Micro. Sci.* **99**, 181-197.
K. JANACEK (1962). — The effect of low concentrations of thiolgroup blocking agents on the outer membrane of frog skin. *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 1962, 42-44.
- [18] L.H. JODREY (1953). — Studies on shell formation. III. Measurement of calcium deposition in shell and calcium turnover in mantle tissue using the mantle - shell preparation and ^{45}Ca . *Biol. Bull.* **104**, 398-407.
- [19] L.H. JODREY et K.M. WILBUR (1965). — Studies on shell formation IV. — The respiratory metabolism of the oyster Mantle. *Biol. Bull.* **108**, 346-358.
- [20] S. KAWAGUTI et N. IKEMOTO (1962). — Electron microscopy on the mantle of a bivalve *Fabulina nitidula*. *Biol. J. Okayama Univ.* **8**, 21-30.
- [21] L.B. KIRSCHNER, A.L. SORENSON et M. KRIEBEL (1960). — Calcium and electric potential across the clam mantle. *Science*, **131**, 735.
- [22] L.B. KIRSCHNER (1962). — Transepithelial electrical phenomena in the Molluscan mantle. *J. Gen. Physiol.* **46**, 362 A.
- [23] K. LÖRCHER et H. NEWESELY (1969). — Calcium carbonate (calcite) as a separate phase besides calcium phosphate apatite in medullary bone of laying hen. *Calc. Tiss. Res.* **3**, 358-362.
- [24] E.J. LUND (1947). — Bioelectric fields and growth. University Cooperative Society Austin, Texas.
- [25] J. MAETZ (1956). — Le dosage de l'anhydrase carbonique. Etude de quelques substances inhibitrices et activatrices. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **38**, 447-474.
- [26] J. MAETZ (1964). — Recherches sur la perméabilité aux électrolytes de la branchie des poissons et sa régulation endocrinienne. *B.I.S.T.*, **86**, 1-60.
- [27] P. MANICHAULT (1960). — Coquille des Mollusques. Structure et Formation, 1823-1843 dans *Traité de Zoologie*, Tome V, Fascicule II. Masson Ed. Paris.
- [28] T.H. MAREN (1967). — Carbonic Anhydrase. Chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.* **47**, 595-781.
- [29] H. NAKAHARA et G. BEVELANDER (1967). — Ingestion of particulate matter by the outer surface cells of the mollusc mantle. *J. Morph.* **122**, 139-146.
- [30] W.T.W. POTTS (1954). — The inorganic composition of the blood of *Mytilus edulis* and *Anodonta cygnea*. *J. Exptl. Biol.* **31**, 376-385.
- [31] J. REYNAUD, Ph. SANTINI, M. BOUTHIER, J. SAVARY et Y. DERRIEN (1969). — Données physiques comparées sur les anhydrases carboniques érythrocytaires humaines A. *Biochim. Biophys. Acta.*, **171**, 363-365.
- [32] P. SIEGMUND et H.J. DULCE (1960). — Einfluss des Carboanhydratase - Inhibitors 2-Acetamino-1,3,4-thio-diazol-sulfonamid-(5) (Diamox) auf den Calciumstoffwechsel von Legehennen. *Hoppe Zeyler Z. Physiol. Chem.* **320**, 149-159.
- [33] P.D. STAHL et A.D. KENNY (1969). — Studies on the mechanism of action of Thyrocalcitonin inhibition with acetazolamide. *Endocrinology*, **85**, 161-164.
- [34] M.E. THOMPSON et J.W. ROSS (1966). — Calcium in sea water by electrode measurement. *Science*, **154**, 1643.
- [35] K.M. WILBUR et L.M. JODREY (1955). — The inhibition of shell formation by carbonic anhydrase inhibitors. *Biol. Bull.* **108**, 359-365.
- [36] K.M. WILBUR (1960). — Shell structure and mineralization in molluscs. Dans « Calcification in Biological Systems ». R.F. Sognaes, éditeur. *American Association for the Advancement of Science*, Washington D.C. Publ. N° 64.15.

Vu
et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

Robert MALLET

Vu et approuvé

Paris, le 17 Mars 1970

Le Doyen de la Faculté des Sciences
de Paris

Marc ZAMANSKY

